

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme LEILA BAKOUR

le lundi 31 mai 2021

Titre :

Production, purification et caractérisation partielle des antibiotiques
sécrétés par la souche *Saccharothrix tamarassentensis* DSM 45947
d'origine saharienne

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (LGC)

Directeur(s) de Thèse :

MME FLORENCE MATHIEU

MME HADJIRA BOUDJELLA

Rapporteurs :

MME NAWEL BOUCHERBA, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa

M. STEPHANE DELAUNAY, UNIVERSITE LORRAINE

Membre(s) du jury :

MME ATIKA MEKLAT, ECOLE NORMALE SUPERIEURE KOUBA - ALGER, Président

M. CEDRIC BRANDAM, TOULOUSE INP, Invité(e)

MME FLORENCE MATHIEU, TOULOUSE INP, Membre

MME HADJIRA BOUDJELLA, ECOLE NORMALE SUPERIEURE KOUBA - ALGER, Membre

MME LYNDA LAMARI, ECOLE NORMALE SUPERIEURE KOUBA - ALGER, Invité(e)

M. YACINE GOUDJEL, Université Amar Telidji Laghouat, Membre

Je dédie ce travail à

*Mes Chers parents **Khedoudja et Djoudi***

*Votre soutien et votre écoute ont toujours été sans faille, merci infiniment à vous, particulièrement à ma chère et précieuse mère à qui je rends un grand hommage car sans elle je n'en serai pas là, et ce tout au long de mon parcours, c'est encore elle qui m'a poussée, encouragée et aidée afin de pouvoir achever ce doctorat en prenant soin de mon petit **Aydan** que je lui ai confié alors qu'il n'avait que trois mois de vie pour pouvoir effectuer mon stage de 18 mois en France. Mama, tu as été plus qu'une maman plus qu'une grand-mère, que Dieu te prête santé et vie pour le meilleur inshallah.*

*Mes Sœurs, **Assia, Hana et Farah,***

*Bien qu'éparpillées aux quatre coins de la planète vous étiez avec moi toujours présentes et au fait de ce qui se passait dans ma vie, vos encouragements et votre amour, m'ont porté...que Dieu vous bénisse vous, vos chers maris, **Nordine, Nabil et Moncef** ainsi que mes chers nièces et neveux que j'aime tant ; **Nélia, Nolan, Massil, Ella et Neil.***

*Mes Enfants, **Anis et Aydan,***

Cette aventure nous a fait grandir ensemble, certes on a traversé de dures épreuves mais cela vous a certainement fait devenir plus autonomes et plus responsables. Cette aventure nous a appris aussi, que quelques soit l'endroit où l'on se trouve sur cette terre, des gens bien existent et que tout est possible quand on a la bonne volonté et la foi en Dieu tout puissant.

***Anis**, mon amour de fils, tu as été brave, courageux, gentil et toujours volontaire durant cette aventure que tu as vécu à mes côtés, tu m'as soutenu et accompagné en France, tu m'as rendu frère tant de fois, je t'aime tellement mon grand.*

***Aydan**, mon miracle, mon bonheur, mon ange, chaque jour passé loin de toi était un supplice, chaque jour passé auprès de toi est un enchantement et un rayonnement de bonheur, tu m'as tant apporté...tu nous as tant apporté, je t'aime tellement mon « Lapinouche ».*

*Mon Mari, **Rafik***

*Ton amour, ton écoute, ton assistance et ta confiance ont toujours été mes principaux moteurs. Tu m'as soutenu et supporté jusqu'au bout. Je suis fière, **Rafik**, d'être la femme d'un homme comme toi.*

*Mes chères **Karima et Rahma** d'avoir été à nos côtés et à mes cousines **Sandra et Samia** pour leurs encouragements et leur soutien.*

***Nora et tonton Rabah Bakour**, pour leur présence encore et toujours et leur gentillesse.*

Mes Amis(es).

Yasmine Oulmou, ma meilleure amie, pour son soutien et son écoute où que je sois,

Theldja Nessah et sa famille ; Tu as tant compté lorsque j'étais absente !

Affaf Laassami et à sa chère et tendre famille,

Sonia Kaci, Amel Alouache, Sofiane Boudjellaba, Amina Dahmani, Antoine Goulloumy, Merci pour vos encouragements, nos discussions animées et vos sourires.

Mes Amis(es) de l'Université de Bejaïa,

Ibtissem Djinni, Samira Temzi, Aziz Messis, Alima Garout, Nawel Boucherba, Samiha Souagui, Fardia Bendali... Merci

Avant-propos

Cette thèse est le fruit de la collaboration entre l'Ecole Normale Supérieure d'Alger (ENS-Kouba) et l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INP-Toulouse). Les travaux ont été menés entre le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba (Algérie) et le Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS/INPT/UPS), au sein de l'équipe - Bioprocédés et Systèmes Microbiens de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT).

Je tiens à remercier **M. ZITOUNI Abdelghani** et **Mme. Catherine XUEREB**, les Responsables des deux établissements de permettre la collaboration grâce à laquelle cette thèse a pu être effectuée en cotutelle dans le cadre du Programme algérien PNE.

L'idée de ce travail de thèse a été inspirée et recommandée par le défunt et regretté **Pr SABAOU Nasserredine**, notre laboratoire et tous ceux qui ont eu la chance de pouvoir collaborer avec lui, lui doivent tant. Lorsque, j'étais à Toulouse, il m'écrivait régulièrement pour me guider dans mes manipulations et lors de ses séjours à l'ENSAT, il se consacrait avec détermination et acharnement afin de pouvoir lever les difficultés que je rencontrais lors de mes purifications et études chimiques. **M. SABAOU**, détenait un don, celui d'avoir l'intuition et la détermination, des qualités essentielles pour tout chercheur chevronné. Il était passionné et si sérieux, nous avons tant encore à apprendre de lui. Je lui rends hommage et prie pour que la paix et la miséricorde de Dieu soient sur lui.

Mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance à mes responsables de thèse, **Mme le Pr BOUDJELLA Hadjira** et **Mme le Pr MATHIEU Florence**,

Florence, merci pour la grande confiance que tu as placée en moi. Ton accueil à Toulouse, tes encouragements, ton support et surtout pour avoir facilité mon intégration à part entière à l'ENSAT.

Hadjira, je voudrais t'exprimer ma gratitude en acceptant de diriger cette recherche. Aussi pour ton aide et ton soutien, mais surtout tes conseils avisés en particulier lors de la phase de rédaction. C'est toi qui m'as suggéré et encouragé pour inclure l'optimisation statistique.

Mes sincères remerciements à **M le Pr BOURAS Noureddine**, pour son aide, ses conseils et pour tout l'intérêt et le temps qu'il a consacré à mon travail.

Aux membres de notre jury de thèse, pour l'honneur qu'ils nous ont fait de participer à ce jury :

À **Mme le Professeur MEKLAT Atika**, de l'École Normale Supérieure de Kouba, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse, Hommages respectueux.

À **Mme le Professeur LAMARI Lynda**, de l'École Normale Supérieure de Kouba, qui nous a fait l'honneur d'accepter d'examiner et d'évaluer ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect les plus sincères.

À **M. DELAUNAY Stéphane** Professeur à l'ENSAIA, Lorraine, pour avoir accepté d'être le rapporteur et d'examiner mon travail. Je lui exprime mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance.

À **M. BRANDAM Cédric**, Professeur à l'INP-ENSIACET, Université de Toulouse, ma reconnaissance pour avoir accepté de porter son jugement sur ce travail.

À **M. GOUDJAL Yacine**, Professeur à l'Université Amar Telidji, Laghouat, j'exprime toute ma gratitude de participer à ce jury et d'apporter sa contribution à ce travail.

À **Mme le Professeur BOUCHERBA Nawal**, de l'UAM, Bejaïa, qui nous fait l'honneur de participer à cette soutenance et d'évaluer ce travail, nous lui exprimons nos vifs remerciements.

Je remercie également le **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de l'Algérie** pour le soutien financier dans le cadre de ma bourse intergouvernementale durant mon stage en FRANCE.

Merci, aux deux laboratoires de recherche, LBSM et LGC, qui m'ont notamment soutenu matériellement durant toutes mes manipulations. Comme je remercie vivement les deux ingénieurs de laboratoire **Mme. Sonia KACI AMARA** (LBSM) et **M. Philippe ANSON** (LGC).

Ma gratitude et mon éternelle reconnaissance à **M. ZITOUNI Abdelghani** et **M. FERHAT Mohamed Amine** (Chargé de la Post Graduation et de la Formation Doctorale ENSK) pour leur professionnalisme, leur aide, contribution et coopération durant le traitement de mon dossier.

À **Mme Catherine AZZARO-PANTEL** (Directrice de l'école doctorale MEGEP) et **Mme Kamila KOZIURA** (secrétariat de MEGEP), votre soutien, votre écoute, votre patience et votre disponibilité m'ont été d'un immense réconfort plus d'une fois, je ne l'oublierai jamais.

À **Mme Françoise Violeau** (Responsable de la Direction de la Recherche) qui au hasard d'une rencontre dans les couloirs de l'INP a changé le cours de mon séjour scientifique à TOULOUSE.

Merci à mes collègues doctorants, docteurs et professeurs, pour leurs encouragements notamment ; **Affaf Laassami, Lynda Lamari, Dalila Boubetra, Rabiaa Merrouche, Atika Meklat, Samira Tata, Fouzia Chabane Chaouche, Souraya Boulkour, Zitouni Abdelghani, Guendouz Dif, Bouras Nouredine, Bellaouni Ahmed, Nadjat Djemouai, Wassila Aigoun, Omrane Toumatia, Karima Bouti, Saliha Zebiri, Hakima Nekhili, Khaoula Bouznada, Goudjal Yacine, Zemmoum Miyada, Amina Matmoura, Rafika Saker, El hadj Driche, Said Belghit, Mokrane Salim, Saadi Sid Ahmed, Abdelhadi Lahoum, Nadia Azzoune, Farida Boudjellal, Nora Khebbizi, M Badji Boubekour, M Riba Amar.**

Je tiens enfin à remercier des membres de l'équipe du LGC, à savoir **Philippe Anson, Rhoda Steinert El Khoury et Selma Snini**...Mention spéciale à **Philippe**, pour ta présence, ton efficacité, ta disponibilité, ta gentillesse qui étaient d'une aide inestimable, reste comme tu es ne change rien !!!

« Le chemin parcouru pour accéder aux méandres de la connaissance, peut sembler long et sinueux, mais il n'en est que plus bénéfique ». Anonyme

« Sans doute c'est le savant qui fait la science, mais c'est aussi la science qui fait le savant, qui l'éduque ».
Gaston BACHELARD

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS		
LISTE DES TABLEAUX		
LISTE DES FIGURES		
LISTE DES PUBLICATIONS		
LISTE DES COMMUNICATIONS		
ENCADREMENTS		
RESUME		
ABSTRACT		
ملخص		
INTRODUCTION GENERALE	1	
Chapitre I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE		
I	ETAT ACTUEL DE LA RECHERCHE DES ANTIBIOTIQUES	4
1.	Application des antibiotiques	5
2.	La résistance microbienne aux antibiotiques et les infections	5
3.	Recherche de nouveaux antibiotiques à partir de sources naturelles	8
4.	Importance des actinobactéries mycéliennes dans la recherche des antibiotiques	10
4.1.	Les actinobactéries rares comme sources d'antibiotiques	11
5.	Méthodes de criblage primaire de l'activité antimicrobienne	12
5.1.	Méthodes classiques	13
5.2.	Méthodes moléculaires	14
II	LE GENRE SACCHAROTHRIX	15
1.	Position taxonomique du genre <i>Saccharothrix</i>	16
2.	Caractéristiques morphologiques, chimiques et phylogéniques du genre <i>Saccharothrix</i>	16
3.	Espèces appartenant au genre <i>Saccharothrix</i>	18
4.	Écologie et distribution dans la nature	19
5.	Métabolites secondaires sécrétés par les espèces du genre <i>Saccharothrix</i>	19
III	PRESENTATION DE <i>SACCHAROTHRIX TAMANRASSETENSIS</i> SA198	21
1.	Origine et position taxonomique de la souche	21
2.	Potentiel producteur d'antibiotiques de la souche	22
IV	INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES PAR LES ACTINOBACTERIES MYCELIENNES	23
1.	Facteurs nutritionnels	24
1.1	Effet de la source de carbone	24
1.2	Effet de la source d'azote	25

1.3	Effet de la source de phosphate	28
1.4	Effet des éléments minéraux et des oligoéléments	29
2.	L'inoculum	29
3.	Les facteurs physico-chimiques	30
3.1	Effet du pH	30
3.2	Effet de la température	30
3.3	Effet des conditions hydrodynamiques	31
3.4	Effet du temps d'incubation	32
V.	OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES	32
1.	Méthode "one factor-at-a-time"	36
2.	Méthodes statistiques d'optimisation	36
2.1	Les plans d'expériences	37
2.2	Les logiciels statistiques	38
2.3	Les techniques du screening « Plackett-Burman Design »	39
2.4	Modélisation	41
2.5	Modélisation par la méthodologie des surfaces de réponse	42
CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES		
I.	LA SOUCHE <i>SACCHAROTHRIX TAMANRASSETENSIS</i> SA198	46
1.	Origine de la souche	46
2.	Conservation de la souche	46
II.	ÉTUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES DE LA SOUCHE <i>SX. TAMANRASSETENSIS</i> SA198	46
1.	Méthode classique de recherche du pouvoir antagoniste	47
1.1	Méthode des stries croisées	47
1.2	Méthode moléculaire : Recherche des gènes de biosynthèse des antibiotiques	47
III.	CINETIQUE DE PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE SA198 EN MILIEU LIQUIDE	49
1.	Le milieu de culture pour les pré-cultures et les cultures de production	50
1.1	Les pré-cultures	50
1.2	Les cultures pour les cinétiques de production	51
1.3	Les sources d'azote	51
1.4	Les sources de carbone	52
2.	Mesures de l'activité antimicrobienne, de la croissance et du pH	52
2.1	Mesure de l'activité antimicrobienne	53
2.2	Mesure de la croissance	53
IV.	OPTIMISATION STATISTIQUE DE LA PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	53
1.	Détermination des facteurs influençant la production de l'activité antimicrobienne par Plackett-Burman design (PBD)	54

2.	Optimisation des variables significatives par la « méthodologie des surfaces de réponse » et le plan « Box Behnken »	58
3.	Validation des modèles expérimentaux	59
V.	PRODUCTION ET PURIFICATION DES ANTIBIOTIQUES	60
1.	Conditions de culture pour la production des antibiotiques	60
2.	Extraction des substances antimicrobiennes	62
2.1.	Extraction à partir du filtrat de culture	62
2.2.	Extraction à partir de la biomasse mycélienne	63
3.	Purification des antibiotiques par HPLC	64
VI.	CARACTERISATION PARTIELLE DES ANTIBIOTIQUES	65
1.	Spectrophotométrie UV-visible	65
2.	Spectrométrie de masse	65
3.	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton	66

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I.	ÉTUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES DE LA SOUCHE SA198 DE <i>Sx. TAMANRASSETENSIS</i>	67
1.	Spectre d'activité de la souche SA198 de <i>Sx. tamanrassetensis</i>	67
1.1	Mise en évidence par la méthode des stries croisées	67
1.2	Mise en évidence par la méthode moléculaire : Recherche des gènes de biosynthèse des antibiotiques	69
1.3	Discussion et conclusion	69
II.	PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE EN MILIEUX DE CULTURE AGITES	73
1.	Cinétique de production avec différentes sources d'azote	74
1.1	Milieu de base-glucose additionné de corn steep liquor	74
1.2	Milieu de base glucose additionné de la peptone	75
1.3	Milieux base-glucose additionnés d'extrait de levure ou de valine	75
1.4	Milieu de base-glucose additionné de leucine	78
1.5	Milieux de base-glucose additionnés d'extrait de malt ou de caséine	78
1.6	Milieux de base-glucose additionnés d'arginine ou de tryptone	80
1.7	Milieux de base-glucose additionnés de tyrosine ou d'alanine ou de sulfate d'ammonium	81
1.8	Milieux de base-glucose additionnés de proline ou de méthionine ou lysine ou cystine	81
	Choix de la meilleure source d'azote	81
2.	Cinétique de production avec différentes sources de carbone	83
2.1	Milieu de base-CSL additionné de glucose	83
2.2	Milieu de base-CSL additionné de fructose	83
2.3	Milieu de base-CSL additionné de saccharose	85

2.4	Milieu de base-CSL additionné de dextrines ou de succinate ou de pyruvate ou d'acétate de sodium ou de propionate	86
	Choix de la meilleure source de carbone	87
3.	Discussion	89
4.	Cinétique de production dans le milieu ISP2	94
4.1	Résultats	95
4.2	Discussion	96
5.	Comparaison entre les milieux ISP2 et MB-CSL-saccharose	98
5.1	Résultats	98
5.2	Discussion	101
III.	OPTIMISATION STATISTIQUE DE LA PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	103
3.1	Résultats	104
3.1.1	Plackett-Burman pour le criblage des facteurs influençant l'activité antimicrobienne	104
3.1.2	Optimisation par Box Behnken design et « response surface methodology »	106
3.1.3	Représentations bi-dimensionnelles	113
3.1.4	Validation des modèles expérimentaux	119
3.2	Discussion	120
IV.	PURIFICATION DES ANTIBIOTIQUES	123
1.	Extraction des substances antimicrobiennes	123
1.1	Extraction à partir du filtrat de culture	123
1.2	Extraction à partir du mycélium	124
1.3	Discussion	124
2.	Tests de vérification	125
2.1	Vérification de la production dans le milieu ISP2	125
2.2	Vérification de l'identité de la souche SA198	126
3.	Purification des antibiotiques par HPLC	126
3.1	Purification de l'extrait organique	126
3.2	Purification de l'extrait aqueux	128
3.3	Discussion	132
V.	CARACTERISATION PARTIELLE DES ANTIBIOTIQUES	133
1.	Caractérisation par Spectrophotométrie UV-visible	133
2.	Spectrométrie de masse	134
3.	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	135
4.	Discussion	136
VI.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	136
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
	ANNEXE	175

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANOVA	Analysis of Variance
ATCC	American Type Culture Collection
BB	Box-Behnken
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
BBD	Box-Behnken Design
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCD	Centrale Composite Design
DAB	Acide diaminobutyrique
DAP	Acide diaminopimélique
dl	Degrés de liberté
DO	Densité optique
eDNA	Environmental DNA
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, German Collection of Microorganisms
ENSAT	École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse
EA	Extrait aqueux
EO	Extrait organique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ISP2	International Streptomyces Project 2 (milieu de culture)
LBSM	Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens
MK	Ménaquinone
Nano-ESI-MS	Nano-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRPS	Non-Ribosomal Peptide Synthetases
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
OFAT	One factor at a time
PB	Plan Plackett-Burman
PBD	Plan Plackett-Burman
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PKS	Polyketide Synthases
q. s. p	Quantité suffisante pour
RAM	Résistance antimicrobienne
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPM	Rotation par minute
RSM	Response surface methodology
SA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la Méricilline
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la Méricilline
sd	Standard deviation
SEM	Moyenne de l'erreur type standard
Sx.	<i>Saccharothrix</i>
UR	<i>Umbelopsis ramanniana</i>

LISTE DES TABLEAUX	Page
Tableau 1. Liste des espèces du genre <i>Saccharothrix</i> .	18
Tableau 2. Exemples de sources de carbones ayant permis la production d'antibiotiques par différentes espèces de <i>Saccharothrix</i> .	27
Tableau 3. Exemples de sources d'azotes ayant permis la production d'antibiotiques par différentes espèces de <i>Saccharothrix</i> .	28
Tableau 4. Plan Plackett-Burman pour matrice à $n = 12$.	40
Tableau 5. Plan de Box- Behnken pour 3 facteurs.	44
Tableau 6. Liste des amorces utilisées pour l'amplification des domaines cibles des PKS et NRPS.	49
Tableau 7. Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés.	55
Tableau 8. Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 7 variables.	57
Tableau 9. Matrice d'expériences donnée par le modèle « Box Behnken » pour les variables significatives (codes) pour l'optimisation de la production des antibiotiques.	59
Tableau 10. Programme HPLC de purification de l'extrait organique.	65
Tableau 11. Programme HPLC de purification de l'extrait aqueux.	65
Tableau 12. Matrice du plan Plackett-Burman pour sept variables avec les réponses	105
Tableau 13. Plan Plackett-Burman et résultats des analyses de la variance pour la production antimicrobienne de <i>Saccharothrix tamanrassetensis</i> SA198.	110
Tableau 14. Plan Box-Behnken des variables significatives et leurs réponses.	111
Tableau 15. Analyse de la variance (ANOVA) des modèles expérimentaux pour la production de l'activité antimicrobienne contre les trois germes testés.	114
Tableau 16. Estimation des coefficients de régression et leurs niveaux de signification vis-à-vis de la production antimicrobienne contre les trois germes testés SARM, BS et UR d'après les résultats du plan Box-Behnken.	115
Tableau 17. Validation des concentrations optimales des variables en condition non optimisé et optimisées sur l'activité antimicrobienne de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> SA198.	119
Tableau 18. Activités antimicrobiennes des extraits des phases aqueuses et organiques.	124
Tableau 19. Activités antimicrobiennes, temps de rétention et couleurs des principaux pics obtenus lors de la première injection HPLC de l'extrait organique.	128
Tableau 20. Activités antimicrobiennes, temps de rétention et couleurs des principaux pics obtenus lors de la première injection HPLC de l'extrait aqueux.	130

LISTE DES FIGURES	Page
Figure 1. Nombre annuel d'études de modélisation sur la résistance antimicrobienne (RAM) (1990-2016) (Niewiadomska <i>et al.</i> , 2019).	7
Figure 2. Les nouveaux médicaments approuvés du 01 janvier 1981 au 30 septembre 2019.; n = 1881 (Newman et Cragg, 2020).	9
Figure 3. Distribution des sources d'antibiotiques par groupe de microorganisme (Lazzarini <i>et al.</i> , 2001, in Ding <i>et al.</i> , 2019).	11
Figure 4. Organigramme des principales étapes permettant d'identifier des genres d'Actinobactéries et la présence de gènes biosynthétiques (Amin <i>et al.</i> , 2019).	15
Figure 5. Morphologie du genre <i>Saccharothrix</i> . a. schéma représentant la micromorphologie du genre (Sabaou, 1988). b. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage du genre <i>Saccharothrix</i> (Boubetra, 2013).	17
Figure 6. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> SA198 (Boubetra, 2013).	22
Figure 7. Structures des antibiotiques A4 (a), A5 (b) et A5.1 (c) sécrétés par <i>Saccharothrix tamanrassetensis</i> SA 198 (Boubetra, 2013).	23
Figure 8. Schéma reprenant les principales méthodes de recherche utilisées en optimisation (Singh, 2017).	33
Figure 9. Domaine de variation du facteur. Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas (-1) et le niveau haut (+1) (Goupy, 2006).	34
Figure 10. Niveaux des facteurs définissant les points expérimentaux (Goupy, 2006).	35
Figure 11. Points expérimentaux du domaine d'étude défini par l'expérimentateur (Goupy, 2006).	35
Figure 12. Les réponses associées aux points du domaine d'étude formant la surface de réponse. (Goupy, 2006).	35
Figure 13. Plan Box-Behnken pour trois facteurs étudiés (Goupy, 2006).	43
Figure 14. Représentation d'une optimisation d'activité antimicrobienne avec un plan expérimental BB et tracé de contour définissant l'interaction entre le temps d'incubation et la concentration en dihydrogène phosphate de potassium sur l'axe des x et des y respectivement et montrant une réponse représentée sous forme d'hélice.	44
Figure 15. Mise en culture de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> SA198 pour la production des antibiotiques en fioles d'Erlenmeyer.	51
Figure 16. Protocole de suivi des cinétiques de culture de production des antibiotiques.	52
Figure 17. Schéma du protocole d'optimisation statistique de la production de l'activité antimicrobienne par la souche SA198.	56
Figure 18. Schéma illustrant les différentes étapes de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques.	60
Figure 19. Mise en culture sur fermenteur en mode discontinu de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> pour la production des antibiotiques dans 2 L de milieu optimisé.	61
Figure 20. Schéma général de l'installation du bioréacteur.	63

Figure 21. Activité antimicrobienne de <i>Saccharothrix tamanrassetensis</i> SA198 contre plusieurs microorganismes tests évaluée par la méthode des stries croisées.	68
Figure 22. Photographie de l'inhibition microbienne de <i>Saccharothrix tamanrassetensis</i> SA198 évaluée par la méthode des stries croisées en présence des germes <i>Staphylococcus aureus</i> 639c résistant à la méticilline (MRSA) ; <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 66330 et <i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829.	68
Figure 23. Détection par PCR du domaine NRPS pour <i>Sx. tamanrassetensis</i> SA198.	69
Figure 24. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> cultivée dans le MB-Glc en présence de corn steep liquor (a) ou de peptone (b).	76
Figure 25. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes contre SA (a), BS (b) et UR (c) de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> cultivée dans le MB-Glc en présence d'extrait de malt ou de caséine ou d'arginine ou de tryptone.	79
Figure 26. Activités antimicrobiennes contre UR (a) ; SA et BS (b) au jour de production optimale de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> cultivée dans le MB-Glc additionné de différentes sources d'azote.	82
Figure 27. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> cultivée dans le MB-CSL en présence de glucose (a) ou de fructose (b).	84
Figure 28. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes contre SA (a), BS (b) et UR (c) de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> cultivée dans le MB-CSL en présence de dextrans ou de succinate ou d'acétate de sodium ou de pyruvate ou de propionate.	86
Figure 29. Activité antimicrobienne au jour de production optimale de la souche <i>S. tamanrassetensis</i> cultivée dans le MB-CSL additionné de différentes sources de carbone.	88
Figure 30. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche <i>Saccharothrix tamanrassetensis</i> cultivée dans le milieu ISP2.	96
Figure 31. Cinétique de l'activité antimicrobienne de la souche <i>Sx. tamanrassetensis</i> contre SA (a), BS (b) et UR (c) dans les milieux MB-CSL-saccharose et ISP2.	100
Figure 32. Effet des paramètres de culture étudiés dans le milieu MB-CSL-saccharose sur l'activité antibactérienne de la souche SA198 vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la Méticilline 639c.	107
Figure 33. Effet des paramètres de culture étudiés dans le milieu MB-CSL-saccharose sur l'activité antibactérienne de la souche SA198 vis-à-vis de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633).	108
Figure 34. Effet des paramètres de culture étudiés dans le milieu MB-CSL-saccharose sur l'activité antibactérienne de la souche SA198 vis-à-vis de <i>Umbelopsis ramanniana</i> (NRRL 1829).	109
Figure 35. Représentations graphiques en 2D définissant l'effet du CSL du saccharose et du KH_2PO_4 sur la production de l'activité antimicrobienne par <i>Sx. tamanrassetensis</i> contre les germes SARM, BS et UR.	118-119

Figure 36. Concentrations optimales recommandées des composées CSL, KH ₂ PO ₄ et saccharose dans le milieu semi-synthétique optimisé pour atteindre une activité antimicrobienne maximale produite par <i>Sx. tamanrassetensis</i> SA198.	120
Figure 37. Activités contre <i>U. ramanniana</i> NRRL 1829 (en haut) et <i>S. aureus</i> SARM 639c (en bas) des extraits de la phase organique (org) et aqueuse (aq) issus du filtrat de culture de la souche SA198 testés par antibiographie.	124
Figure 38. Profil HPLC de l'injection de l'extrait organique brut issu du filtrat de culture.	127
Figure 39. Profil HPLC de l'injection de l'extrait aqueux brut issu du filtrat de culture sur MSS.	129
Figure 40. Profil d'élution de la deuxième injection du pic A1.	130
Figure 41. Profil d'élution de la deuxième injection du pic actif A5.	131
Figure 42. Tests antibiogramme des pics A1 et A5 purifiés après réinjections successives en HPLC contre <i>U. ramanniana</i> NRRL 1829 (à gauche) et <i>S. aureus</i> SARM 639c (à droite).	131
Figure 43. Spectres UV-visible d'absorption des composés A1 (a) et A5 (b) dissouts dans de l'eau ultrapure.	133
Figure 44. Spectre de masse du produit A5 produit par la souche <i>Saccharothrix tamanrassetensis</i> .	134
Figure 45. Spectres de RMN du proton des antibiotiques A1 (a) et A5 (b) produits par la souche <i>Saccharothrix tamanrassetensis</i> , montrant la présence d'aromatiques, d'insaturations et de fonctions alcools.	135
Figure 46. Structure de l'acide 4-hydroxyphénylacétique.	136

LISTE DE PUBLICATIONS

1- **Bakour Keramane L.**, Boudjella H., Meklat A., Bouras N., Sabaou N., Mathieu F. (2020). Antimicrobial screening of *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 and effect of carbon and nitrogen sources on antibiotic production. *Algerian Journal of Arid And Environment (AJAE)*. vol. 9, n°1, Novembre 2020 : 46-67.

2- **Bakour Keramane L.**, Boudjella H., Bouras N., Mathieu F. (2021). Optimization of medium components to improve the antimicrobial activity of a new Saharan actinobacterial strain *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947. *Research Journal of Biotechnology (Res. J. Biotech.)* vol. 16 (7) Juillet 2021: 35-47.

LISTES COMMUNICATIONS

Bakour Keramane L., Boudjella H., Meklat A., Bouras N., Sabaou N., Mathieu F. Production de métabolites antimicrobiens de *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 en fermenteur batch. Les 3èmes Journées JBSM 2019 de Biologie des Systèmes Microbiens. Le 16 novembre 2019

Bakour-Keramane L., Boudjella H., Sabaou N., Mathieu F. 2017. Statistical optimization of medium components to improve the antibiotic activity of an actinobacteria strain *Saccharothrix tamanrassetensis* isolated from a Saharan soil. Les 16^{èmes} Journées Internationales de Biotechnologie-JIB2017. Les 18-22 décembre 2017, Yasmine Hammamet, Tunisie. Communication orale.

Laassami Affaf, Boudjella Hadjira, **Bakour Leila** et Sabaou Nasserline. 2014. -Influence de quelques sources de carbone sur la production d'antibiotiques par une souche de *Saccharothrix* isolée d'un sol saharien. IIème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bioressources (BVBR), Les 18-20 mars 2014, Tabarka, Tunisie. Communication orale.

Laassami Affaf, Boudjella Hadjira, **Bakour Leila** et Sabaou Nasserline. 2015. - Activités antifongiques d'une souche de *Saccharothrix (actinomycetale)* isolée d'un sol saharien. La XIX^{ème} Journée Nationale de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de médecine, Constantine. Communication affichée.

Laassami Affaf, Boudjella Hadjira, **Bakour Leila** et Sabaou Nasserline. 2014. Influence de quelques sources d'azote sur la production d'antibiotiques par la souche SA198 de *Saccharothrix tamanrassetensis*. Premières Journées LBSM, à El-Hamma, Alger les 14 et 15 décembre 2014. Communication affichée.

Laassami Affaf, Boudjella Hadjira, **Bakour Leila** Et Sabaou Nasserline. 2014. Influence de quelques sources d'azote sur la production d'antibiotiques par une souche de *Saccharothrix* isolée d'un sol saharien. Les 3èmes Journées des Sciences de la Nature et de la Vie, les 11 et 12 novembre 2014 à l'Université Abderrahmane Mira de Béjaia. Communication affichée.

ENCADREMENTS

Mémoire de Master en Biologie Option : Microbiologie / Bactériologie. Mise en évidence et amélioration de la production de molécules bioactives d'une souche d'actinobactérie *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 isolée d'un sol saharien. Soutenu le 03 juillet 2016 à Université Blida -

Résumé

La souche *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947, désignée SA198, est une nouvelle espèce d'actinobactérie d'origine saharienne, qui lors d'un travail précédent, s'est avérée produire dans le milieu complexe ISP2 trois nouvelles molécules antibiotiques à activité antifongique et antibactérienne. Notre travail a pour but d'explorer le potentiel antimicrobien de la souche, d'améliorer la production des molécules antimicrobiennes, de les purifier, et de les caractériser.

La souche SA198 a montré une activité antagoniste intéressante, en particulier contre les agents pathogènes. La recherche de certains gènes de biosynthèse par PCR a permis de détecter la présence des gènes non-ribosomal peptide synthétases (NRPS).

Pour améliorer la production de l'activité antimicrobienne, une stratégie d'optimisation séquentielle a été adoptée. Au départ, la production de cette activité (antifongique et antibactérienne) a été étudiée en suivant des cinétiques en milieu synthétique additionné de différentes sources de carbone et d'azote. L'activité la plus élevée a été obtenue avec le corn steep liquor et le saccharose. Par la suite, l'application du plan d'expérience de Plackett-Burman (PBD) a montré que le saccharose, le corn steep liquor et le KH_2PO_4 étaient les paramètres les plus importants influençant la production de l'activité antimicrobienne. Pour une production maximale de cette activité, la méthodologie de surface de réponse (RSM) avec le plan de Box-Behnken (BBD), a fixé les valeurs optimales des variables importantes à : 7 g/L de saccharose, 52 g/L de corn steep liquor et 0,9 g/L de KH_2PO_4 , et un milieu de culture optimisé est formulé. Dans ces conditions optimales, une augmentation de la production de l'activité antimicrobienne de 32% contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, 27% contre *Bacillus subtilis* et 36% contre *Umbelopsis ramanniana*, est observée.

A partir d'une culture en fermenteur en mode discontinu, dans le milieu de culture optimisé, l'extraction des molécules antibiotiques est réalisée avec le dichlorométhane. L'activité antimicrobienne est détectée dans la phase aqueuse contrairement au travail de référence. La purification par HPLC avec une colonne hydrophile a révélé la présence de sept pics actifs. Deux d'entre eux, A1 et A5, à activité à la fois antifongique et antibactérienne ont été purifiés et caractérisés partiellement. Les spectres UV-visible des 2 molécules indiquent l'absence de polyènes. La résonance magnétique nucléaire du proton suggère que ces 2 antibiotiques possèdent une structure aromatique glycosylée. Les résultats obtenus encouragent la poursuite des études sur les antibiotiques de la souche SA198.

Mots-clés : *Saccharothrix tamanrassetensis*, production, activité antimicrobienne, cinétiques, sources de carbone et d'azote, optimisation, RSM, purification, caractérisation partielle.

Abstract

The strain *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947, designated SA198, is a new actinobacteria species of Saharan origin, which in previous study was found to produce in the ISP2 complex medium three new antibiotic compounds with antifungal and antibacterial activities. The present study aims to explore the antimicrobial potential of the strain, to improve the antimicrobial activity production, to purify and characterize the produced molecules.

The strain showed an interesting antagonist activity, in particular against pathogenic germs. The antimicrobial potential of the strain was examined by PCR for the presence of some genes responsible for antibiotic biosynthesis. The non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) gene was detected.

In order to improve the antimicrobial activity, a sequential optimization strategy has been adopted. The antimicrobial potential was evaluated by following kinetics in a synthetic medium supplemented with different carbon and nitrogen sources. The highest bioactivity was obtained with corn steep liquor and sucrose. In a second step, Plackett-Burman experimental Design (PBD) was performed in order to determine the most significant culture parameters affecting the antimicrobial activity. It showed that corn steep liquor and KH_2PO_4 were the most influencing parameters. For maximum antimicrobial activity production, the response surface methodology (RSM) with Box-Behnken design (BBD) set the optimal values of the important variables at: 7 g / L of sucrose, 52 g / L of corn steep liquor and 0.9 g / L of KH_2PO_4 , and an optimized medium was formulated. In these optimal conditions, an increase in antimicrobial activity production of 32% against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, 27% against *Bacillus subtilis* and 36% against *Umbelopsis ramanniana* was recorded.

From a culture in batch fermenter using the optimized culture medium, the extraction of the antibiotic molecules was carried out with dichloromethane. The antimicrobial activity was detected in the aqueous phase unlike the reference work. Purification by HPLC with a hydrophilic column revealed the presence of seven active peaks. Among them, A1 and A5 with both antifungal and antibacterial activity, have been purified and partially characterized. The UV-visible spectra of the two molecules indicate the absence of polyenes. Proton nuclear magnetic resonance suggests that these 2 antibiotics have a glycosylated aromatic structure. The obtained results encourage the continuation of studies on antibiotics of the SA198 strain.

Keywords : *Saccharothrix tamanrassetensis*, production, antimicrobial activity, kinetics, carbon and nitrogen sources, optimization, RSM, purification, partial characterization.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La recherche de nouveaux agents antimicrobiens efficaces est une préoccupation de santé mondiale et se justifie par l'échec thérapeutique qu'enregistrent les antibiotiques utilisés actuellement contre de nombreuses souches super résistantes (Wright, 2017). En effet, l'utilisation excessive et répétée des antibiotiques en médecine, ainsi que le recours aux antibiotiques dans l'alimentation animale (en élevage) et l'agriculture, en actions prophylactiques ou thérapeutiques, ont entraîné, année après année, une diminution croissante du pipeline d'antibiotiques efficaces menaçant ainsi la santé humaine (Theuretzbacher *et al.*, 2019; Antonio *et al.*, 2020).

Pour résoudre la crise des antibiotiques, la découverte de nouveaux composés provenant de diverses sources naturelles, comme les micro-organismes, occupe une place de choix au sein des programmes de recherche mondiaux avec la perspective de la mise au point de nouveaux médicaments (Kat et Baltz, 2016; Rossiter *et al.*, 2017; Genilloud, 2019; Li *et al.*, 2019; Abdel-Razek *et al.*, 2020).

En plus d'être les microorganismes les plus largement répandus dans la nature, les actinobactéries sont de remarquables producteurs de composés essentiels pour l'homme, la médecine vétérinaire ainsi que pour l'agriculture, avec à eux seuls 70 à 80% des antibiotiques existants (Jayaprakashvel, 2018; Robertsen et Musiol-Kroll, 2019). En dépit du défi de la résistance antibiotique, les actinobactéries demeurent des « sources providentielles » dans la nature et qui attendent d'être explorées (Lee *et al.*, 2018).

Pour accroître les chances de découverte de nouveaux antibiotiques, la piste de l'exploration d'isolats d'actinobactéries rares (autres que les streptomycètes) provenant d'écosystèmes particuliers et sous-explorés a contribué à l'augmentation du nombre de nouveaux genres producteurs de composés néobioactifs (Djinni *et al.*, 2019).

Le potentiel de cette approche a été largement rapporté ces dernières années en criblant des souches rares (*Actinomadura*, *Isoptericola*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Leifsonia*, *Streptacidiphilus*, *Sinomonas*, *Terrabacter*, *Streptosporangium*, *Saccharothrix*...) isolées dans des environnements extrêmes (Sabaou *et al.*, 1998; Lazzarini *et al.*, 2001; Barakate *et al.*, 2002; Donadio *et al.*, 2002; Moncheva *et al.*, 2002; Azman *et al.*, 2015; Bouznada *et al.*, 2017; Lahoum *et al.*, 2017; Ibeyaima *et al.*, 2018; Djinni *et al.*, 2019).

En Algérie, des travaux soutiennent cette démarche, notamment ceux réalisés par notre laboratoire (LBSM) en collaboration avec le (LGC) sur les sols du Sahara algérien, qui exposés à un climat aride, constituent des écosystèmes particuliers. Ces études rendent compte d'une

INTRODUCTION GENERALE

remarquable diversité de nouvelles espèces découvertes; dont la plupart ont montré un fort potentiel de biosynthèse de nouveaux antibiotiques (Lamari *et al.*, 2002a; Zitouni *et al.*, 2004; Bouras *et al.*, 2008; Boudjella *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2010 et 2011; Meklat *et al.*, 2011; Boubetra *et al.*, 2013; Saker *et al.*, 2015a et b; Chaabane Chaouch *et al.*, 2016b; Khebizi *et al.*, 2018; Lahoum *et al.*, 2019).

Explorer de nouveaux taxons d'actinobactéries a toujours été une stratégie réussie dans le processus de découverte de nouveaux antibiotiques. Cependant, l'amélioration de la production s'avère une étape essentielle, particulièrement lorsque la souche produit plusieurs antibiotiques en quantités minimales (Lee *et al.*, 2018). L'optimisation du milieu de production et des conditions de culture est toujours l'une des expériences les plus étudiées avant toute production de métabolites à grande échelle (Wang *et al.*, 2011; Mandenius, 2016; Singh *et al.*, 2017).

Les méthodes d'optimisation sont généralement de deux types ; non statistiques et statistiques (Mandenius et Brundin, 2008; Singh *et al.*, 2017). La première méthode appelée aussi "méthode classique" consiste à tester un seul facteur (ou une variable) à la fois. Elle nécessite une multitude d'expériences et ne rend pas compte de l'interaction entre les différentes variables (Sharma *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). Cependant, les méthodes de conception expérimentale statistique, par exemple les plans de surface de réponse, sont largement utilisées pour sélectionner et déterminer les niveaux optimaux des variables significatives avec l'avantage d'appréhender l'effet simultané de plusieurs variables (Jakubiec-Krzesniak *et al.*, 2018). Ces méthodes permettent de trouver les meilleures conditions opératoires pour une production maximale, tout en minimisant le temps et le coût (Bezerra *et al.*, 2018). Une fois les conditions de production optimales déterminées, des cultures de la souche productrice peuvent être réalisées. Les molécules antibiotiques sont ensuite extraites, purifiées et caractérisées.

Le présent travail aborde ces approches et fait suite aux travaux menés par Boubetra (2013). Lors de ces travaux, une nouvelle espèce d'actinobactérie *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947^T, désignée SA198 et isolée à partir d'un échantillon de sol saharien, a révélé un potentiel antimicrobien intéressant. Elle produit dans le milieu complexe ISP2 de petites quantités de trois nouveaux antibiotiques ayant une activité antibactérienne et antifongique (Boubetra *et al.*, 2013).

Notre étude s'est fixée comme objectif principal d'explorer le potentiel antimicrobien de la souche, d'améliorer la production des autres antibiotiques mineurs non encore déterminés chez cette nouvelle souche. Pour y parvenir, un milieu de culture de base synthétique est choisi pour la production des métabolites avec un défi nouveau par rapport à la démarche classique utilisée par notre équipe, celui d'appliquer les méthodologies des plans d'expériences statistiques ou DoE pour « Design of Experiments ».

INTRODUCTION GENERALE

Cette étude s'inscrit dans l'optique des attentes formulées par la conjoncture actuelle mondiale et celles fixées par les équipes du LBSM et du LGC pour contribuer à la production et la découverte de nouvelles molécules bioactives. De plus, notre démarche considère la biodiversité comme source de ces molécules, et emploie des outils et des méthodes d'optimisation actuellement utilisés dans les procédés de biotechnologie.

Ce manuscrit s'organise en trois chapitres

✓ Le premier chapitre est une revue bibliographique évoquant plusieurs aspects, notamment ceux ayant trait aux antibiotiques en général, aux données disponibles sur les *Saccharothrix* à ce jour en particulier la souche SA198 de *Saccharothrix tamanrassetensis* et qui se termine par une introduction sur les plans d'expériences et quelques notions de base.

✓ Le second chapitre est consacré à la description du matériel et des méthodes mises en œuvre pour la réalisation de cette étude.

✓ Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus et à leur discussion. Il s'agit, de l'étude approfondie des propriétés antimicrobiennes de la souche SA198, des cinétiques de production testant des sources de carbone et d'azote sur un milieu de base synthétique et favorisant la production d'antibiotiques ; suivis de l'optimisation statistique par les plans d'expériences du milieu sélectionné. Une culture dans le milieu optimisé en fermenteur en batch est conduite pour produire les molécules bioactives, qui sont extraites et purifiées. Les produits purs sont caractérisés partiellement par des études spectroscopiques.

Une conclusion finale et des perspectives sont invoquées pour achever l'étude.

Chapitre I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Les notions abordées dans ce premier chapitre constituent une base théorique au travail de thèse. Nous essayerons d'abord de présenter brièvement l'état actuel de la recherche sur les antibiotiques, en abordant le phénomène de résistance microbienne, le métabolisme secondaire microbien comme source de nouveaux antibiotiques, en particulier celui des actinobactéries, et les méthodes de criblage de l'activité antimicrobienne. Notre attention sera ensuite focalisée sur le genre *Saccharothrix*, sa position taxonomique, ses principales caractéristiques taxonomiques, sa distribution dans la nature, et les principaux antibiotiques produits par les souches de ce genre. Un intérêt particulier sera ensuite accordé à la présentation de la souche *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 en insistant sur les travaux antérieurs réalisés, tels que son origine, son identification taxonomique, et son potentiel producteur d'antibiotiques. Une autre partie de ce chapitre sera consacrée à une synthèse sur les conditions de culture influençant la production des antibiotiques dont les facteurs nutritionnels et les conditions de culture. Cette partie sera suivie par un état des lieux sur les méthodes d'optimisation statistique de la production des antibiotiques avec l'objectif de mettre en évidence les méthodes utilisées dans ce travail et répondant mieux à notre objectif, notamment, le « Plackett-Burman Design » et la méthodologie de surface des réponses.

I. ETAT ACTUEL DE LA RECHERCHE SUR LES ANTIBIOTIQUES

En 1947, Waksman avait défini le terme « antibiotique » comme suit : « Un antibiotique est une substance chimique, produite par des microorganismes et ayant la capacité d'inhiber la croissance et même de tuer des bactéries et autres microorganismes » (Waksman, 1947). Aujourd'hui, « antibiotique » a plusieurs significations : (I) un produit chimique organique d'origine naturelle ou synthétique inhibant ou tuant les bactéries pathogènes ; (II) toute substance antimicrobienne ; ou (III) dans la tradition de Waksman, ce terme est limité aux substances antimicrobiennes uniquement d'origine microbienne (Mohr, 2016). La découverte des antibiotiques au début du vingtième siècle a été l'une des réalisations les plus importantes de l'histoire du médicament. Et pour cause, les maladies infectieuses et contagieuses sont un des plus cruels fléaux qui menacent l'humanité et plusieurs épidémies et pandémies (peste noire 1347-1352; grippe espagnole 1918-1919 ; choléra 1926-1832 ; SIDA 1981-aujourd'hui ; COVID 2020-aujourd'hui...) auront marqué l'histoire humaine (Wolfe et Dunavan, 2007). Le recours aux antibiotiques et la prolongation de la durée de vie sont parmi les grandes avancées de la médecine moderne. La découverte de la pénicilline en 1928 (Fleming, 1929) et le développement de la médecine dès les années 1940 (Chain *et al.*, 1940; Abraham *et al.*, 1941), ont fondé les bases pour la recherche de produits naturels microbiens (Demain et Adrio, 2008). L'arrivée des antibiotiques a contribué à

sauver nombre de vies humaines en luttant contre les maladies infectieuses responsables des principaux cas de morbidité¹ et de mortalité² humaines (Aminov, 2010).

1. Application des antibiotiques

Depuis leur découverte, les antibiotiques sont largement utilisés dans divers domaines. En effet, dans le domaine médical, en plus du traitement des maladies infectieuses, les antibiotiques sont aussi utilisés pour prévenir les infections en chirurgie générale, et dans le cas des greffes, etc. Ils ont trouvé d'autres applications comme agents anticancéreux, antiparasitaires, antihypertenseurs, immunosuppresseurs, et anti-inflammatoires, etc.

Les antibiotiques sont également utilisés dans des applications autres que le domaine médical, notamment en élevage agricole dont les produits sont destinés à la consommation humaine, en agriculture et aquaculture pour la promotion de la croissance animale et la prévention des infections microbiennes, en tant que bioherbicides et insecticides, et enfin dans le domaine des cosmétiques (Chapman et Perry, 2003; Challis, 2005; Davidson, 2005; Kumar *et al.*, 2005; Bartlett *et al.*, 2013; Spellberg et Gilbert, 2014; Pareek *et al.*, 2015; Hamedi., *et al.*, 2017). Toutefois certaines applications sont très règlementées et controversées et les organismes de protection sanitaires à l'instar de l'OMS veillent et légifèrent sur l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux destinés à l'alimentation (Companyó *et al.*, 2009).

2. La résistance microbienne aux antibiotiques et les infections

La recherche de nouveaux antibiotiques est justifiée par l'apparition de plus en plus croissante des cas de résistance microbienne aux antibiotiques. Ce phénomène correspond au fait qu'un traitement antibiotique ne soit plus efficace contre une infection bactérienne. Cette difficulté, résulte de l'administration répétée d'antibiotiques chez l'homme ou l'animal qui crée des conditions, appelées « une pression de sélection » favorisant l'acquisition et la dissémination de souches résistantes aux antibiotiques. En effet, après la révolution de « l'âge d'or », de la découverte des groupes importants d'antibiotiques, notamment les tétracyclines, les céphalosporines, les aminoglycosides et les macrolides, les principaux problèmes de la thérapie anti-infectieuse ont été résolus. Malheureusement, les antibiotiques ont très vite vu un risque de perte de leur efficacité en raison de l'augmentation du phénomène de résistance.

¹ Nombre d'individus atteints par une maladie dans une population donnée et pendant une période déterminée.

² Quantité d'êtres vivants qui meurent d'une même maladie.

Alexander Fleming avait déjà souligné dans son discours de remise du prix Nobel, que le dosage de la pénicilline pouvait appliquer une pression sélective induisant les bactéries à développer une résistance à ces médicaments. C'est ainsi que de nouvelles maladies infectieuses sont apparues et la résistance aux antimicrobiens (RAM) dès lors, est devenue un fardeau majeur pour la santé humaine et animale.

Actuellement, les infections bactériennes et fongiques sont de plus en plus difficiles à gérer en raison de la prévalence accrue d'agents pathogènes de type multirésistance médicamenteuse (MRM). De plus, le développement de résistances croisées aussi bien dans la population que dans le milieu hospitalier avec peu d'options thérapeutiques, associé à des taux de mortalité élevés impose le recours à de nouveaux antibiotiques (Genilloud, 2012). L'émergence d'agents pathogènes bactériens de type MRM échappant à l'action de la plupart des antibiotiques tels que le groupe formé par *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp. ou communément appelé ESKAPE est une préoccupation majeure, une situation exacerbée par le déclin alarmant de la mise au point de nouveaux composés antimicrobiens au cours de la dernière décennie (Silver, 2011). Les champignons responsables d'infections fongiques invasives (IFI) ne sont pas en reste. De nombreuses espèces fongiques peuvent provoquer un taux de mortalité supérieurs à 50% et ont de ce fait un impact majeur sur la morbidité et la mortalité chez l'homme (Van Daele *et al.*, 2019). Par ailleurs, les IFI sont responsables d'environ un million et demi de décès chaque année. Parmi ces agents fongiques, on peut citer, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *Paracoccidioides brasiliensis* et *P. lutzii* et qui peuvent induire un risque élevé de mortalité (Nicola *et al.*, 2019). Ces chiffres déjà inquiétants semblent ne pas cesser d'augmenter en dépit des solutions thérapeutiques déjà mises en place (Van Daele *et al.*, 2019).

Le problème de la RAM a réellement pris de l'ampleur récemment au regard du nombre croissant d'articles scientifiques publiés, mais aussi du nombre élevé de travaux dédiés à la recherche de nouvelles molécules antibiotiques (Figure 1).

Il faut signaler qu'en plus du phénomène de RAM, la toxicité et la mauvaise solubilité de certains antibiotiques découverts, limitent considérablement leur utilisation clinique malgré leur grande efficacité, et contribuent à la crise des antibiotiques. En effet, l'arsenal thérapeutique approuvé pour le traitement des mycoses s'arrête à quelques médicaments antifongiques, plus encore, la plupart d'entre eux ont des limites telles que leur faible efficacité et leur haute toxicité (Nicola *et al.*, 2019).

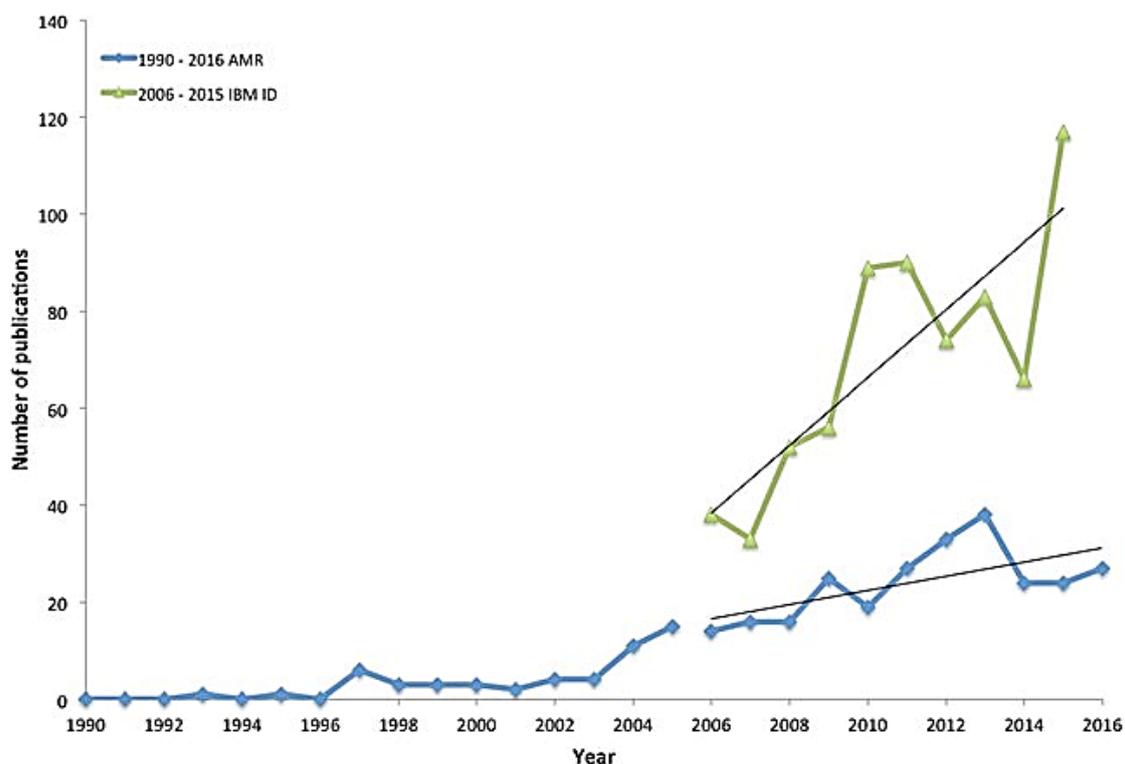


Figure 1. Nombre annuel d'études de modélisation sur la résistance antimicrobienne (RAM) (1990-2016) (Niewiadomska *et al.*, 2019). Cette Figure compare le nombre annuel d'études de modélisation de la RAM (basé sur les données de Temime *et al.* (1990-2006) (2008) ainsi que l'analyse faite par Niewiadomska *et al.* (2006-2016) (2019), avec le nombre de modèles individuels utilisés pour analyser les maladies infectieuses (IBM ID) identifié par Willem *et al.* entre 2006 et 2015 (2017).

D'un autre côté, des fongicides environnementaux sont utilisés en agriculture pour réduire au minimum/maximum la détérioration des cultures, et des molécules telle que la natamycine (macrolide polyène) est utilisée comme conservateur alimentaire aux États-Unis et dans certains autres pays alors qu'il subsiste un risque sérieux de développement de RAM dû à ces deux utilisations (Dalhoff, 2018).

Lorsque les antibiotiques sont utilisés dans la production animale, leur utilisation prolongée en tant que promoteurs de croissance des animaux d'élevage est connue pour favoriser l'émergence de résistances (Wall *et al.*, 2016; Magnusson *et al.*, 2019). Alors qu'il a été démontré que dans les pays (Norvège, Suède et Finlande) où l'utilisation de ces substances (par exemple les fluoroquinolones) est interdite dans la production animale, des niveaux d'antibiorésistance sont très faiblement observés (Magnusson *et al.*, 2019). Bien que le recours aux antibiotiques chez les animaux sains et infectés à des fins de croissance, de prophylaxie et de métaphylaxie, ait été considérablement réduit dans les pays à revenu élevé ces dernières années, les données disponibles indiquent que la RAM continuera à augmenter dans les pays à revenu faible et intermédiaire dans les prochaines décennies et ce en raison de la demande croissante en protéines animales notamment

(Van Boeckel *et al.*, 2015). Par conséquent, il y aura probablement une augmentation de la RAM pour des traitements couramment utilisés dans ces pays et régions et qui ne sera pas de bon augure pour la gestion des infections chez l'Homme et les animaux. C'est ainsi que récemment, a été signalée la résistance à la colistine, un antimicrobien utilisé comme dernier recours pour le traitement de multirésistances infectieuses chez l'homme, en Chine et ensuite découverte dans la plupart des régions du monde (Skov et Monnet, 2016).

L'aggravation des RAM ainsi que l'apparition de maladies provoquant des crises mondiales comme celle de la COVID-19 entraînent l'accélération des enjeux pour la sauvegarde de la santé humaine dans le monde. Les médecins doivent plus fréquemment utiliser des antibiotiques afin de traiter les complications dues aux infections bactériennes qui accompagnent généralement les maladies virales (grippe, COVID-19, etc.) De ce fait, aujourd'hui, l'antimicrobiorésistance est largement considérée par l'humanité comme un challenge à relever (OMS, 2019³). Parmi les initiatives entreprises dans la lutte contre la RAM il y a le développement de vaccins, de tests de diagnostic plus rapides pour garantir l'administration d'une antibiothérapie appropriée, et les thérapies immunitaires (Spellberg, 2014). Ces mesures pourraient apporter des solutions prometteuses pour la prévention. Cependant, une fois que l'infection se produit chez un hôte humain, les antibiotiques restent la seule alternative face aux infections bactériennes et fongiques. Par conséquent et dans le contexte actuel de crise sanitaire mondiale, le besoin de nouvelles classes d'antibiotiques et l'amélioration des anciens composés restent plus importants que jamais (Woodford *et al.*, 2011; Ventola, 2015; Tshokey *et al.*, 2017; Genilloud, 2018; Mobarki *et al.*, 2019; Robertsen et Musiol-Kroll., 2019; Akpan *et al.*, 2020).

3. Recherche de nouveaux antibiotiques à partir de sources naturelles

La nature recèle des ressources illimitées de nouvelles molécules bioactives, et les recherches peuvent s'avérer très utiles dans le processus de découverte de médicaments (Abdel-Razek *et al.*, 2020). Ces molécules bioactives sont appelées produits naturels (PN). Les PN sont des métabolites et/ou des sous-produits dérivés d'organismes vivants, tels que les plantes, les animaux et les microorganismes (Baker *et al.*, 2000).

Les PN d'origine microbienne ont non seulement suscité la découverte de la plupart des classes d'antibiotiques et d'antifongiques actuellement utilisées en clinique mais continuent toujours d'être la source de molécules et de structures originales (Genilloud, 2019).

³ <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

Actuellement et face à la crise croissante de la résistance aux antibiotiques, plusieurs auteurs s'accordent sur le fait que la découverte et le développement d'une nouvelle gamme de médicaments antimicrobiens est la meilleure solution (Taylor, 2013; Newman *et al.*, 2015; Rossiter *et al.*, 2017; Genilloud, 2019; Van Bergeijk *et al.*, 2020). Et de fait, chaque semaine, des articles scientifiques dans des revues à comité de lecture sont publiés, décrivant les effets positifs des PN sur le processus de guérison de diverses maladies humaines et animales. Par ailleurs, nombre de médicaments utilisés dans le traitement de divers cancers, des maladies cardiovasculaires, du diabète, etc., sont en majorité des PN ou des dérivés (Sorokina et Steinbeck, 2020).

Signalons que les PN d'origine microbienne sont les métabolites ayant la plus large application dans la santé humaine en raison de leurs structures et fonctions uniques, ils sont d'ailleurs considérés comme la pierre angulaire de la découverte de médicaments (Abdel-Razek *et al.*, 2020).

Enfin, les revues de littérature effectuées dans le domaine de l'exploitation et l'exploration des PN ne manquent pas. Outre celles citées plus haut dans ce même paragraphe, nous citons les revues de Newman et Cragg (1997, 2003, 2007, 2012, 2013, 2016 et 2020) et qui concernent la période 1981 à 2019 et illustrées par la Figure 2, ou celles effectuées par Genilloud et régulièrement actualisées (2011, 2012, 2014, 2017a, b, 2018 et 2019), ou encore par Li *et al.* (2019), Sorokina et

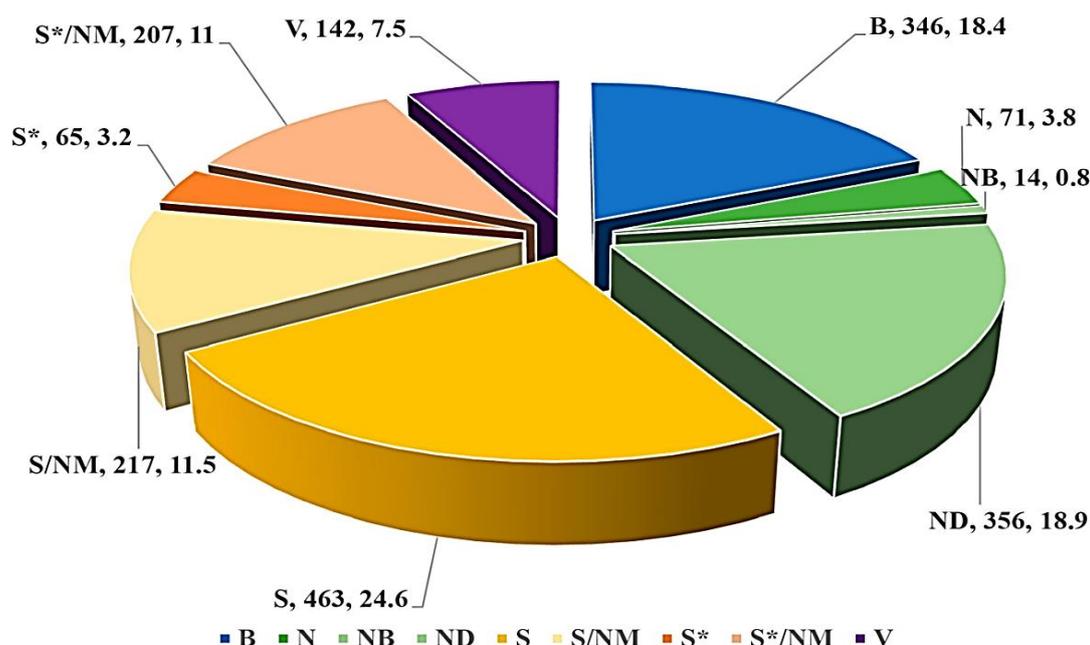


Figure 2. Les nouveaux médicaments approuvés du 01 janvier 1981 au 30 septembre 2019; n = 1881 (Newman et Cragg, 2020).

B : Macromolécules biologique, 1997 ; N : **Produits naturels inchangés**, 1997 ; NB : Médicament d'origine végétale (mélange défini), 2012 ; ND : Dérivé de produit naturel, 1997 ; S : Médicaments synthétiques, 1997 ; S* : Médicaments synthétiques (NP pharmacophore), 1997 ; V : Vaccins, 2003; /NM : Imitation de produit naturel, 2003.

Steinbeck (2020); Hug et al. (2020) et Abdel-Razek et al. (2020) s'il ne fallait citer que ces auteurs, elles montrent l'importance des PN comme sources de nouveaux antibiotiques.

4. Importance des actinobactéries mycéliennes dans la recherche des antibiotiques

Les actinobactéries représentent un groupe abondant de microorganismes largement répandus dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Ce sont des bactéries à Gram positif ou Gram variable, la plupart ayant une teneur élevée en GC, allant de 51% à plus de 70% (Stackebrandt et Schumann, 2006; Ventura *et al.*, 2007; Lawson, 2018). Elles sont connues pour leur grande capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales induisant de fait une grande variabilité métabolique (Bawazir et Shantaram., 2018). En effet, elles produisent une vaste gamme de composés (Chaudhary *et al.*, 2013; Barka *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018; Van Bergeijk *et al.*, 2020), ce qui leur a valu un grand intérêt en recherche scientifique. Ces composés vont des antibiotiques aux enzymes, aux vitamines, et agents anticancéreux. Elles jouent également un rôle essentiel dans le secteur agricole, où elles sont connues pour produire des pesticides, des herbicides (ex. la phosphinotricine), des insecticides (ex. la spinosyne A et l'ivermectine B), des antitumoraux (ex. la doxorubicine et la bléomycine), des antifongiques (ex. l'amphotéricine B et la nystatine), des immunosuppresseurs (ex. la FK-506 et la rapamycine), et de nombreux autres antibiotiques de grande importance clinique et commerciale (Oskay *et al.*, 2004; Parungao *et al.*, 2007; Dilip *et al.*, 2013; Lo Grasso *et al.*, 2016; Robertsen et Musiol-Kroll., 2019).

Le point de départ du rôle précieux attribué aux actinobactéries aussi bien sur le plan économique que sur le plan biotechnologique, est venu de la découverte dans les années 40 de l'actinomycine et de la streptomycine produite respectivement par *Streptomyces antibioticus* et *S. griseus*. Depuis, environ 16 000 composés bioactifs issus des actinobactéries ont été identifiés, dont 14 500 sont des antibiotiques (Hamedi *et al.*, 2017). Les actinobactéries ont été l'une des sources les plus importantes de nouveaux antibiotiques, notamment les plus importantes classes de médicaments antimicrobiens, telles que les β -lactames, les tétracyclines, les rifamycines, les aminosides, les macrolides et les glycopeptides (Jose et Jha., 2016; Genilloud, 2017a; Luepke *et al.*, 2017; Jakubiec-Krzesniak *et al.*, 2018; Rangseekaew et Pathom-aree, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

Les métabolites secondaires bioactifs produits par les actinobactéries ont de nombreuses autres indications dans le secteur médical tel que les propriétés anticancéreuses (Ravikumar *et al.*, 2012; Busi *et al.*, 2018) mais aussi des applications en biotechnologie où la recherche est particulièrement intense telle que la production d'éthanol, d'acides organiques ou encore de

protéines recombinées thérapeutiques (Hamed *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018; Tischler *et al.*, 2019).

4.1. Les actinobactéries rares comme sources d'antibiotiques

Les actinobactéries rares (autres que le genre *Streptomyces*) sont appelées ainsi à cause de leur faible nombre d'apparition par rapport à celui des espèces appartenant au genre *Streptomyces* et ce lors d'un isolement par des méthodes conventionnelles (Benhadj *et al.*, 2018) (Figure 3). Parmi les genres appartenant à ce groupe, nous citons *Amycolatopsis*, *Actinokineospora*, *Acrocarpospora*, *Catenuloplanes*, *Kibdelosporangium*, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Saccharothrix*, *Spirilliplanes*, *Thermobifida*, *Virgosporangium* et *Micromonospora*, etc (Amin *et al.*, 2020). Un grand intérêt leur est de plus en plus accordé du fait que plusieurs auteurs défendent l'idée que l'exploration et l'exploitation de ces microorganismes filamenteux, pourraient amener à la découverte de variétés de composés chimiques bioactifs (Amin *et al.*, 2020).

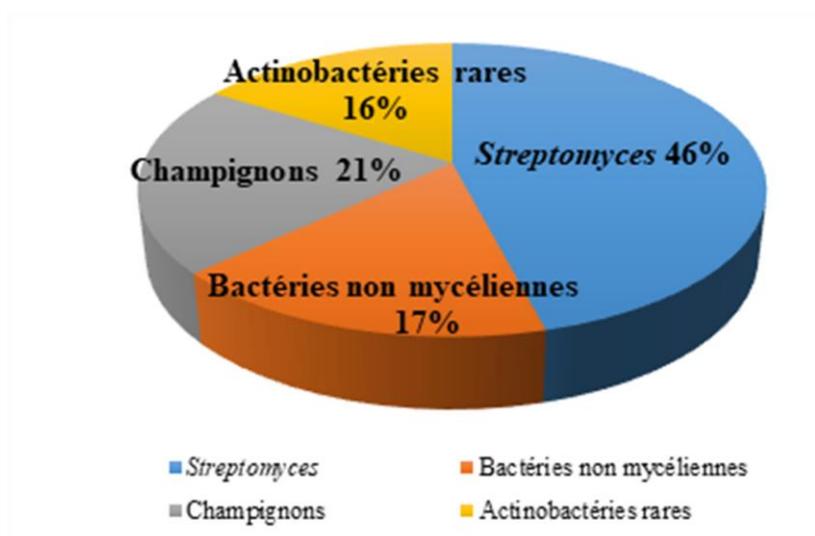


Figure 3. Distribution des sources d'antibiotiques par groupe de microorganisme (Lazzarini *et al.*, 2001, in Ding *et al.*, 2019).

L'émergence de cas de multirésistance chez des bactéries, notamment les agents pathogènes ESKAPE et depuis quelques temps le très résistant aux antibiotiques *Mycobacterium tuberculosis*, sont une menace majeure pour la santé publique dans le monde (Vajs *et al.*, 2017).

De plus, ces dernières années, la surexploitation des bactéries du genre *Streptomyces* issues du sol par les firmes des secteurs pharmaceutiques et agrochimiques ainsi que par de nombreux groupes académiques, a obligé les chercheurs à se tourner vers de nouveaux genres (Lam, 2006). C'est ainsi que s'est manifesté un intérêt soutenu vers des taxons issus d'environnements extrêmes

(Mahajan et Balachandran, 2017), mais aussi l'isolement d'espèces endophytes (Passari *et al.*, 2015; Hug *et al.*, 2018).

Les isolats d'actinobactéries rares analysés se sont révélés être producteurs d'agents antibactériens, antifongiques, antiparasitaires, herbicides, pesticides, anticancéreux, enzymes et agents immunosuppresseurs (Amin *et al.*, 2020). Une revue bibliographique entreprise par Ding *et al.* (2019), a rapporté sur la période allant 2008 à 2018, les structures et métabolites secondaires bioactifs issus d'actinomycètes rares, impliquant 21 genres différents. La même étude conclut que parmi les 341 composés signalés, la majorité appartient aux deux classes des cycles peptidiques et des quinones, avec les genres *Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Nonomuraea* et *Micromonospora* comme principaux producteurs.

Certaines études sur les actinobactéries rares mettent en évidence un excellent pouvoir antimicrobien et une faible toxicité des biomolécules synthétisées avec aussi des structures chimiques assez originales, uniques et inconnues des microorganismes résistants (Bérdy, 2005; Tiwari et Gupta, 2012).

Les sols sahariens d'Algérie ont montré une grande diversité en genres d'actinobactéries des plus abondants aux plus rares, voire même très rares dans le monde, tels que *Actinomadura* (Badji *et al.*, 2005; Lahoum *et al.*, 2016a, b), *Streptosporangium* (Boudjella, 2007; Chaabane Chaouch *et al.*, 2016a, b), *Nocardioides* (Zitouni *et al.*, 2005; Bouras *et al.*, 2015a), *Saccharothrix* (Zitouni *et al.*, 2004a; Boubetra *et al.*, 2013a, b; Boubetra *et al.*, 2015), *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora* (Meklat *et al.*, 2013a, b, c, Saker *et al.*, 2015b), *Planomonospora* et *Planobispora* (Boudjella, 2007; Chaabane Chaouch *et al.*, 2017), etc. Cependant, le genre *Streptomyces* reste prédominant (Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2005; Meklat, 2012).

Depuis 2002 à ce jour, 29 nouvelles espèces d'actinobactéries rares ont été découvertes dans divers écosystèmes en Algérie, avec une grande abondance de nouvelles espèces associées aux sols sahariens, donnant 27 espèces nouvelles appartenant à 15 genres (Djinni *et al.*, 2019). Cinquante métabolites secondaires ont été isolés et identifiés, y compris 17 nouvelles structures moléculaires puis évaluées pour leurs activités biologiques, principalement axées sur les propriétés antibactériennes et antifongiques, y compris parfois la cytotoxicité et la promotion de la croissance des plantes (Djinni *et al.*, 2019).

Par conséquent, les actinobactéries rares sont fortement considérées comme une ressource incontournable pour la découverte de composés significativement actifs.

5. Méthodes de criblage primaire de l'activité antimicrobienne

Ces dernières années, compte tenu de l'intérêt croissant observé pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens à partir des microorganismes, une plus grande attention est accordée au dépistage de l'activité antimicrobienne et aux méthodes d'évaluation. Plusieurs tests antagonistes, dits classiques, sont bien connus et couramment utilisés pour les isolats microbiens supposés producteurs d'antibiotiques. Il s'agit de la méthode des stries croisées sur milieu gélosé (Madigan *et al.*, 1997), la méthode des cylindres d'agar (Eccleston *et al.*, 2008), celle de la diffusion sur disque (Bauer *et al.*, 1966), et celle de la diffusion des puits (Valgas *et al.*, 2007). Cependant d'autres, telles que les méthodes moléculaires sont également utilisées car elles permettent dans le cas des actinobactéries de mettre en évidence des gènes capables de mener à de nouvelles alternatives de molécules bioactives, ainsi il s'agit d'une évaluation plus approfondie et une meilleure connaissance du potentiel producteur des souches (Amin *et al.*, 2019).

5.1. Méthodes classiques

Afin de déterminer le potentiel des souches en ce qui concerne la production de métabolites secondaires antimicrobiens, un criblage primaire des isolats est effectué. Au cours du processus de criblage primaire, un grand nombre d'isolats est criblé contre une gamme de souches sensibles. Sur la base des résultats du dépistage primaire, les isolats présentant des activités antimicrobiennes importantes (distance d'inhibition) sont sélectionnés pour des programmes de dépistage secondaires ultérieurs.

Il existe de nombreuses techniques pour détecter l'activité antimicrobienne ; la plupart d'entre-elles sont basées sur des méthodes impliquant la diffusion à travers des milieux de culture solides ou semi-solides pour inhiber la croissance des microorganismes sensibles/cibles (Lertcanawanichakul et Sawangnop, 2008). Les tests des stries croisées, des cylindres d'agar ou de la double couche sont appliqués contre une série de microorganismes cibles, champignons filamenteux, levures et bactéries, en fonction de l'activité recherchée. La méthode des stries croisées tout comme celle des cylindres d'agar sont des méthodes faciles et relativement rapides pour cribler les souches à la recherche de nouveaux antibiotiques (Velho-Pereira et Kamat, 2011). La méthode de la culture double couche (Harveson et Kimbrough, 2000) convient au dépistage des actinobactéries ayant une activité antifongique. Il est à signaler que l'utilisation d'un milieu de culture universel peut s'avérer trompeur ou inefficace dans le cas notamment du dépistage d'actinobactéries rares nécessitant des milieux inhabituels pour la croissance et la production d'antibiotiques. Aussi, un des inconvénients majeurs de ces méthodes est la difficulté d'obtenir des

données quantitatives, car les zones d'inhibition sont généralement très floues et peu distinctes (Velho-Pereira et Kamat, 2011).

5.2. Méthodes moléculaires

Au cours des dernières années, l'évaluation de l'activité antibiotique des actinobactéries a évolué du point de vue des moyens utilisés. De nouvelles approches et technologies ont été développées et intégrées dans un effort multidisciplinaire visant à exploiter davantage le potentiel de biosynthèse de biomolécules (Figure 4). De nouveaux outils de criblage moléculaire permettent d'identifier directement à partir d'un pool génomique les actinobactéries susceptibles de pouvoir produire des molécules avec des structures chimiques originales. Prévoir et caractériser *in silico* des métabolites secondaires d'origine microbienne à partir de clusters de gènes biosynthétiques a contribué avec succès au développement de nouveaux médicaments (Amin *et al.*, 2019). La métagénomique en tant qu'approche indépendante de la culture repose sur la récupération de l'ADN directement de l'environnement (eDNA) afin d'accéder au réservoir caché de séquences codantes de métabolites secondaires (Brady *et al.*, 2009). L'approche métagénomique associée aux approches classiques basées sur la culture est devenue un moyen important d'obtenir des éléments d'informations approfondis sur la réponse microbienne face à des souches pathogènes (Techtmann et Hazen, 2016).

Comme cela est illustré dans la Figure 4, de nouvelles stratégies ont été élaborées et comprennent : - l'extraction génomique sur des souches microbiennes afin d'étudier les voies de biosynthèse cryptiques ; - expression et interprétation des résultats via des plateformes de séquençage à haut débit ; - comparaison des résultats avec les données bio-informatiques intégrées et les analyses sur site grâce à des outils de détection de nouveaux composés (Genilloud, 2014). C'est ainsi que l'augmentation de la disponibilité de séquences entières de génomes d'actinobactéries a révélé la présence d'un grand nombre de clusters de gènes de voies de biosynthèse de métabolites spécialisés, codant pour une gamme de molécules bioactives telles que antibiotiques, antifongiques, immunosuppresseurs et agents anticancéreux (Hoskisson et Fernandez-Martinez, 2018). Parmi ces molécules bioactives, les peptides et les polycétones constituent un groupe potentiel de produits naturels, principalement synthétisés par deux principaux types d'enzymes : les peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) et les polycétones synthases (PKS) (Weissman, 2009). Les polycétones (PK) et les peptides non-ribosomiques (PNR) sont des métabolites secondaires de microorganismes, pouvant aider ces mêmes microorganismes à s'adapter à l'environnement et à résister à des conditions naturelles stressantes. Jusqu'à présent, plus de 23

000 produits naturels de PK et de PNR ont été identifiés et caractérisés, et ont été largement utilisés comme antibiotiques et agents antitumoraux (Bérdy, 2005; Walsh, 2007; Demain et Sanchez, 2009; Newman et Cragg, 2012; Katz et Baltz, 2016). Les gènes codant pour la synthèse des enzymes à l'origine des PK et des PNR, sont identifiés. Actuellement, les programmes de recherche de nouvelles molécules bioactives reposent sur le screening de ces gènes. Cette recherche se base sur des séquences conservées pour chaque gène en utilisant des amorces dégénérées qui ciblent d'une manière spécifique ces gènes. L'amplification par PCR de l'ADN matrice et la caractérisation des gènes spécifiques nécessitent le recours à des couples d'amorces spécifiques (Metsä-Keletä *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003; Ayuso-Sacido et Genilloud, 2005) et permet de comparer les séquences obtenues avec les séquences présentes dans les banques de données par la réalisation du Blast. Cette comparaison peut indiquer le potentiel des actinobactéries à produire un ou plusieurs types de molécules (Meklat, 2012).

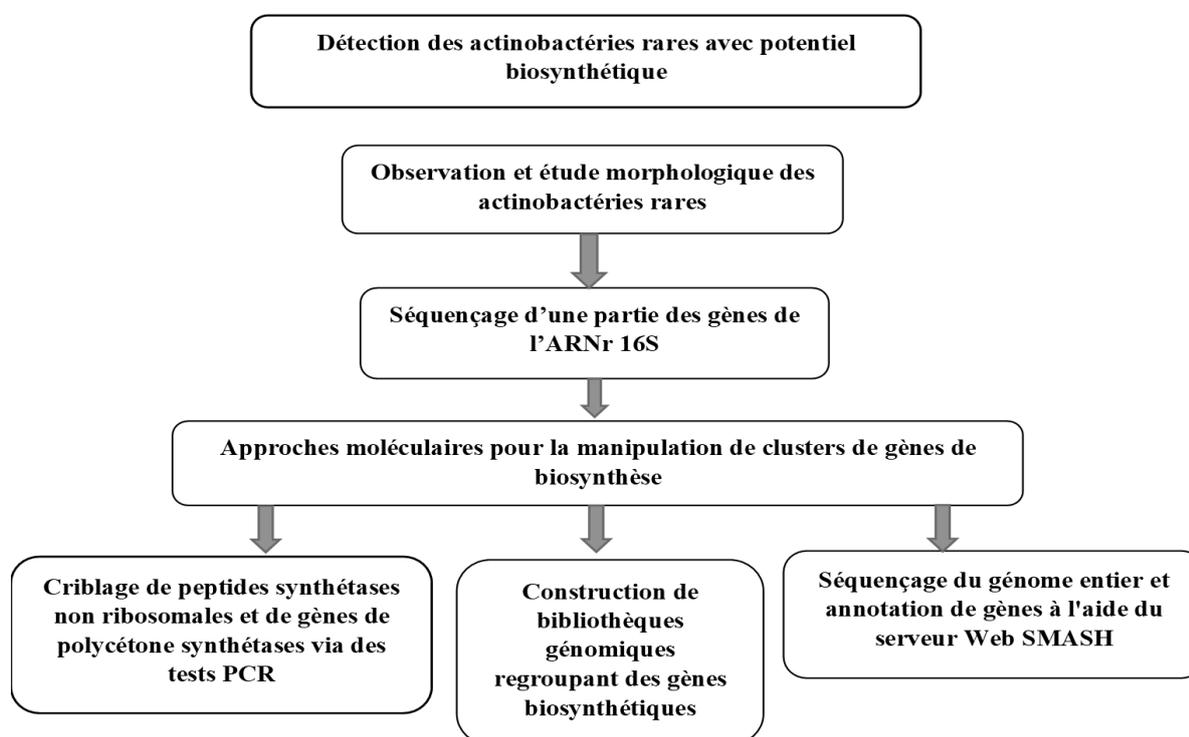


Figure 4. Organigramme des principales étapes permettant d'identifier des genres d'Actinobactéries et la présence de gènes biosynthétiques (Amin *et al.*, 2019).

II. LE GENRE *SACCHAROTHRIX*

Le genre *Saccharothrix*, compte parmi les actinobactéries rares. Il fut décrit pour la première fois par Labeda *et al.* (1984), qui isolèrent à partir d'un échantillon de sol collecté du désert

australien l'espèce type *Saccharothrix australiensis*. Depuis, la liste des membres du genre *Saccharothrix* s'est enrichie de nouvelles espèces soient nouvellement isolées ou encore reclassées. Le genre *Saccharothrix* est, comme nombres d'actinobactéries, saprophyte, chimioorganotrophe, hétérotrophe et aérobie strict. Il est retrouvé dans divers environnements comprenant le sol (Labeda et Lechevalier, 1989; Liu *et al.*, 2014), les déchets végétaux (Otoguro *et al.*, 2009), les mines d'or (Lee *et al.*, 2000), les endophytes végétaux (Yan *et al.* 2012) les déserts arides de l'Algérie (Boubetra *et al.*, 2013a, b ; Boubetra *et al.*, 2015), des Etats Unis (Labeda et Lyons, 1989; Takahashi *et al.*, 1996), de l'Inde (Ibeyaima *et al.*, 2018), de l'Australie (Labeda *et al.*, 1984) mais aussi dans l'eau des lacs, des rivières ou des mers et océans (Karuppiyah *et al.*, 2014; Gan *et al.*, 2015; Dhakal *et al.*, 2017; Subramani *et al.*, 2019).

1. Position taxonomique du genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* fut classé en premier dans la famille des *Pseudonocardiaceae* (Embley *et al.*, 1988; Warwick *et al.*, 1994). Un remaniement opéré par Labeda et Kroppenstedt en 2000 le rattache à la famille des *Actinosynnemataceae*. Toutefois, les outils de la taxonomie moléculaire en perpétuelle évolution, associés à une réorganisation à l'échelle supragénique du taxon reliait désormais ce genre rare dans l'édition du Manuel de Bergey de 2012 à la famille des *Pseudonocardiaceae* dans l'ordre des *Pseudonocardiales*.

Depuis la description de l'espèce type du genre, *Saccharothrix australiensis*, et sa création, nombres d'espèces ont été décrites. Certaines ont été reclassées après avoir appartenues à d'autres genres tels que *Nocardiopsis* et *Nocardia* (Labeda *et al.*, 2001), d'autres encore ont subi un transfert vers d'autres genres ; c'est le cas, notamment, de *Sx. waywayendensis* et *Sx. albidocapillata*, rattachées depuis à *Lentzea*, genre crée par Yassin *et al.* (1995) et *Sx. coeruleoviolacea* rattachée à *Goodfellowiella*, crée par Labeda *et al.* (2008).

2. Caractéristiques morphologiques, chimiques et phylogéniques du genre *Saccharothrix*

Les souches du genre *Saccharothrix* forment un mycélium avec des hyphes aériens abondants ou au contraire très peu abondants selon les espèces et les souches. Ces longs filaments, souvent en "zig-zag", se fragmentent anarchiquement en éléments coccoïdes et en bâtonnets (1 à 2 µm x 0,7 à 1 µm) non mobiles, alors que les filaments issus du mycélium du substrat (excessive ou rare) donnent des éléments coccoïdes (Figure 5) (Labeda et Kroppenstedt, 2000).

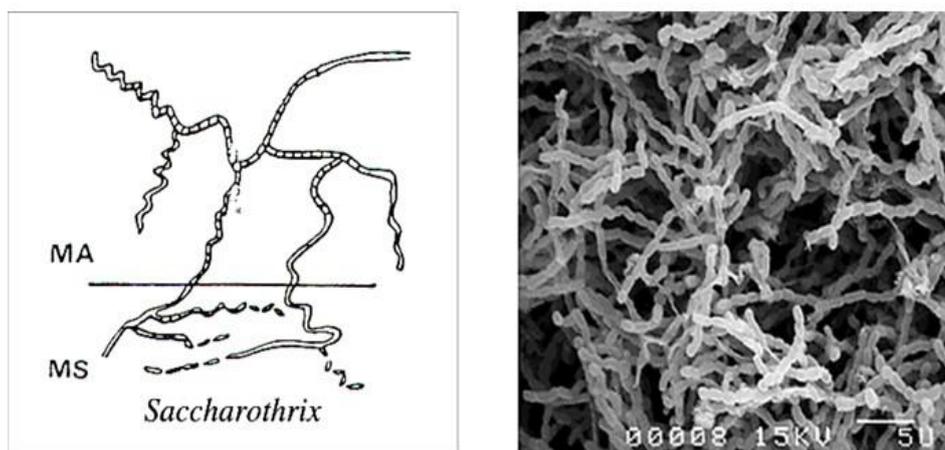


Figure 5. Morphologie du genre *Saccharothrix*. **a.** schéma représentant la micromorphologie du genre (Sabaou, 1988). **b.** Micromorphologie en microscopie électronique à balayage du genre *Saccharothrix* (Boubetra, 2013). MA : mycélium aérien. MS : mycélium du substrat.

Physiologiquement, le genre *Saccharothrix* est caractérisé par une coloration de Gram positive, résistant au lysozyme et catalase positive (Labeda *et al.*, 1984; Labeda et Kroppenstedt, 2000). Chimiotaxonomiquement, il est caractérisé par une paroi cellulaire de type III E, c'est-à-dire, présence de l'isomère DL (méso) de l'acide diaminopimélique et absence de glycine (au niveau de la paroi), présence de sucres caractéristiques qui sont le rhamnose, le galactose et le mannose (dans les cellules entières) et absence d'acides mycoliques pariétaux. Les phospholipides membranaires sont du type PII (présence de phosphatidyléthanolamine = PE et d'hydroxy-PE) ou du type PIV (PE + hydroxy-PE + phospholipides contenant de la glucosamine). Les ménaquinones (lipides membranaires) sont de type MK-9 (H4) ou MK-10 (H4), constitués d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne carbonée aliphatique contenant neuf ou dix unités isoprènes dont quatre sont hydrogénées (4 sites d'hydrogénation) (Labeda *et al.*, 1984; Labeda et Kroppenstedt, 2000). Le profil d'acides gras se compose principalement d'iso- et anteiso-pentadécanoïque, hexadécanoïque, heptadécanoïque et des acides gras saturés ainsi que de petites quantités d'insaturation, à chaîne droite pentadécanoïque, hexadécanoïque, et les acides gras heptadécanoïque (Manuel de Bergey, 2012). En outre, le pourcentage en G+C du genre *Saccharothrix* varie entre 67 et 76 % (Manuel de Bergey, 2012).

3. Espèces appartenant au genre *Saccharothrix*

Aujourd'hui le taxon compte 22 espèces décrites (Tableau 1) dont six ont été révélées au sein du laboratoire LBSM (Algérie) ; *Saccharothrix algeriensis* (Zitouni *et al.*, 2004a), *Sx. saharensis*, *Sx. hoggarensis* (Boubetra *et al.*, 2013a, b), *Sx. tamanrassetensis* (Boubetra *et al.*, 2015), *Sx. isguenensis* sp. nov. (Bouznada *et al.*, 2016b) et *Sx. ghardaiensis* sp. nov. (Bouznada *et al.*, 2017). La position taxonomique de nombreuses souches a pu être clarifiée en établissant des ponts entre les données chimiotaxonomique, morphologique et les propriétés physiologiques associées à l'alignement des séquences de l'ADNr 16S de souches apparentées (Yuan *et al.*, 2010; Labeda *et Goodfellow*, 2012; Li *et al.*, 2015).

Tableau 1. Liste des espèces du genre *Saccharothrix*.

Espèces	Souches-types	Références
<i>Sx. australiensis</i>	NRRL 11239 ^T	(Labeda <i>et al.</i> , 1984)
<i>Sx. texasensis</i>	NRRL B-16107 ^T	(Labeda et Lyons, 1989)
<i>Sx. espanaensis</i>	DSM 44229	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Sx. mutabilis</i> sub sp. <i>mutabilis</i>	DSM 43853 ^T	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Sx. mutabilis</i> sub sp. <i>capreolus</i>	DSM 40225 ^T	(Grund et Kroppenstedt, 1989)
<i>Sx. coeruleofusca</i>	NRRL B-16115 ^T	(Grund et Kroppenstedt, 1989)
<i>Sx. longispora</i>	NRRL B-116116 ^T	(Grund et Kroppenstedt, 1989)
<i>Sx. syringae</i>	NRRL B-16468 ^T	(Grund et Kroppenstedt, 1989)
<i>Sx. algeriensis</i>	NRRL B-24137 ^T	(Zitouni <i>et al.</i> , 2004a)
<i>Sx. xinjiangensis</i>	NBRC 101911 ^T	(Hu <i>et al.</i> , 2004)
<i>Sx. violaceirubra</i>	NBRC 102064 ^T	(Otoguro <i>et al.</i> , 2009)
<i>Sx. variisporae</i>	NRRL B-16296 ^T	(Kim <i>et al.</i> , 2011)
<i>Sx. yanglingensis</i>	KCTC 19722 ^T	(Yan <i>et al.</i> , 2012)
<i>Sx. saharensis</i>	DSM 45457 ^T	(Boubetra <i>et al.</i> , 2013a)
<i>Sx. hoggarensis</i>	DSM 45456 ^T	(Boubetra <i>et al.</i> , 2013b)
<i>Sx. carnea</i>	DSM 45878 ^T	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Sx. tamanrassetensis</i>	DSM 45947 ^T	(Boubetra <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sx. lopnurensis</i>	YIM LPA2h ^T	(Li <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sx. ecbatanensis</i>	DSM 45486 ^T	(Mohammadipanah <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sx. stipae</i>	JCM 30560 ^T	(Lin <i>et al.</i> , 2016)
<i>Sx. isguenensis</i> sp. nov.	MB27 ^T	(Bouznada <i>et al.</i> , 2016b)
<i>Sx. ghardaiensis</i> sp. nov.	MB46 ^T	(Bouznada <i>et al.</i> , 2017)
<i>Sx. tharensis</i> sp. nov.	TD-093 ^T	(Ibeyaima <i>et al.</i> , 2018)

4. Écologie et distribution dans la nature

Le sol est le principal habitat dont est issue la majorité des espèces de *Saccharothrix* connues à ce jour. Cependant, on les retrouve aussi dans de nombreuses autres niches écologiques (Benhadj *et al.*, 2018) : à partir du milieu marin voire à plat de marée (Stevens *et al.* 2007; Gan *et al.*, 2015; Benhadj *et al.*, 2018), d'environnements aériens extrêmes tels que les déserts arides d'Algérie, d'Australie, de Californie, de Chine ou encore d'Inde (Labeda *et al.*, 1984; Labeda et Lechevalier, 1989; Takahashi *et al.*, 1996; Zitouni *et al.*, 2004a; Kalinovskaya *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2012; Boubetra *et al.*, 2015; Mohammadipanah et Wink, 2016; Bouznada *et al.*, 2017; Ibeyaima *et al.*, 2018). Takahashi *et al.* (1996) rapportent l'isolement de plus de trois cent isolats d'actinobactéries de genres rares à partir du désert du Mojave en Californie incluant le genre *Saccharothrix*. D'autres encore se retrouvent dans des habitats pour le moins inattendus comme *Saccharothrix yanglingensis*, une actinobactérie endophyte isolée à partir de la racine de concombre (Yan *et al.*, 2012). Par ailleurs, Adegboye et Babalola (2015; 2016) rapportent avoir identifié la présence de clusters de gènes de biosynthèse d'antibiotiques sur des actinobactéries isolées de sols rhizosphériques grâce à une analyse moléculaire montrant la présence de plusieurs genres d'actinobactérie rares y compris le genre *Saccharothrix*.

Par conséquent, les bactéries du genre *Saccharothrix* constituent un genre écologiquement important, qui jouent un rôle crucial dans plusieurs processus biologiques tels que les cycles biogéochimiques, la production de métabolites secondaires, la bioremédiation, la bio-altération et la croissance des plantes (Bawazir et Shantaram, 2018).

5. Métabolites secondaires sécrétés par les espèces du genre *Saccharothrix*

Les travaux de recherche consacrés à l'étude des métabolites produits par les espèces répertoriées du genre *Saccharothrix*, rendent compte de l'existence de nombres de composés biologiques actifs, dont plusieurs sont cliniquement utilisés comme agents antibiotiques, anticancéreux et immunosuppresseurs (Chaudhary *et al.*, 2013). La spécificité des métabolites sécrétés par les membres de ce genre réside dans la nature chimique assez diversifiée. Un des premiers antibiotiques décrits fut la nocamycine, sécrétée par une souche de *Sx. syringae* (Horvath *et al.*, 1979). On peut ainsi trouver des polyamines ou des aminoglycosides (Takahashi *et al.*, 1986), des benzoquinones (Takahashi *et al.*, 1986; Isshiki *et al.*, 1989), des alcaloïdes (Suzuki *et al.*, 1991), des glycopeptides (Takeuchi *et al.*, 1992), des nucléosides carbocycliques (Bush *et al.*, 1993), des composés phosphorés acides et hydrophiles (Kimura *et al.*, 1995). Les saccharomicine A et B ont été décrites comme étant produites par *Sx. espanaensis* (Kong *et al.*, 1998), et qui sont deux

antibiotiques heptadecaglycoside et qui ont montré une activité antibactérienne aussi bien *in vitro* que *in vivo* contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline et *Enterococci* résistante à la vancomycine (Singh *et al.*, 2000). D'autres métabolites ont été aussi décrits à l'instar des dithiolyrrolones (hétérocycles azotés et soufrés) (Lamari *et al.*, 2002a, b), des heptadécaglycosides qui appartiennent à une nouvelle classe d'antibiotiques (Singh *et al.*, 2000), des anthracyclines (Zitouni *et al.*, 2004b, c) et des macrolides (Zitouni, 2005). La sacchathridine A, un dérivé naphthoquinonique agissant comme inhibiteurs des prostaglandines, a été aussi isolée à partir d'une souche de *Saccharothrix* sp. (Nakae *et al.*, 2013).

Les travaux de Aouiche *et al.* (2012) sur une souche de *Saccharothrix* ont mis en évidence la production de chloramphénicol. De même que les études de Boubetra *et al.* (2013c) ont également mis en évidence de nouveaux composés antimicrobiens sécrétés par une nouvelle souche de *Saccharothrix* (SA198), publiée en 2015 (Boubetra *et al.*, 2015) sous le nom *Sx. tamanrassetensis* (voir paragraphe ci-après). En 2017, les études menées par Lahoum *et al.* ont montré que la souche *Saccharothrix* sp. ABH26, isolée d'un sol saharien produit plusieurs antibiotiques telles que la caerulomycine A, la caerulomycine F et la caerulomycinonitrile (signalées pour la première fois chez le genre *Saccharothrix*), ainsi que deux nouvelles molécules bioactives appartenant à la famille des cyanogrisides, nommées cyanogriside I et cyanogriside J (Lahoum *et al.*, 2017).

Par ailleurs, les travaux cités précédemment rapportent que certains antibiotiques sécrétés par des souches de *Saccharothrix* spp. seraient doués d'une activité antibactérienne (anti-Gram positif et plus rarement anti-Gram négatif), comme la swalpamycine B, ou antifongique comme le thiazolylypyridine, ou encore antibactérienne et antifongique à la fois, comme les dithiolyrrolones, la dopsisamine, la formamycine, la caerulomycine A, la caerulomycine F, la caerulomycinonitrile, et les cyanogrisides I et J. Enfin, certains autres composés sont doués d'activités antitumorales (ammocidine, pluraflavines), antivirales (fluvirucines), herbicides (phosphonothrixine et coformycine = nucléosides carbocycliques), ou inhibitrices de métalloprotéases ou d'autres enzymes (molécule WS75624) (Bouznada, 2018).

Nous complétons cet inventaire par les résultats cités dans une revue bibliographique récemment entreprise par Ding *et al.* (2019) qui rend compte de molécules très intéressantes, produites par *Saccharothrix* sp. A1506 (isolé du sol). Cette souche a produit trois nouveaux macrolides, les saccharothriolides D, E et F et dont les deux composés E et F présentent une cytotoxicité vis-à-vis de cellules de fibrosarcome humaines (Lu *et al.*, 2016). Dans une autre étude portant sur cette même souche, *Saccharothrix* sp. A1506 produit une molécule identifiée comme étant la saccharothriolide B et dont le précurseur la présaccharothriolide X présente une activité cytotoxique à l'égard de cellules de fibrosarcome humaines (Lu *et al.*, 2018).

Autres molécules, les saccharothrixones A, B et C, (nouvelles polycétones aromatiques), et la saccharothrixone D (nouvel analogue de la tetracenomycine), produites par *Saccharothrix* sp. 10-10. La saccharothrixone D présente un effet cytotoxique dirigé vers une lignée de cellules cancéreuses (Gan *et al.*, 2015). Enfin, une étude chimique réalisée sur l'extrait brut de *Saccharothrix xinjiangensis* NRRL B-24321 a conduit à l'isolement de deux nouvelles polycétones de type macrolactone, les tianchimycines A et B, ainsi qu'un composé connu, la swalpamycine B, ayant des propriétés antimicrobiennes (Wang *et al.*, 2013).

III. PRESENTATION DE *SACCHAROTHRIX TAMANRASSETENSIS* SA198

Les travaux de Boubetra (2013) et Boubetra *et al.* (2013b ; 2015) sur la souche *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 ont été consacrés à l'étude taxonomique de la souche ainsi qu'à l'étude de ses activités antibiotiques. Dans ce qui suit, nous allons présenter une synthèse sur sa position taxonomique et sur les principaux antibiotiques produits.

1. Origine et position taxonomique de la souche

La souche SA198 a été isolée par Zitouni (1995) à partir d'un échantillon de sol du Hoggar, récolté dans la région de Tamanrasset (extrême Sud algérien) lors d'un criblage de souches d'actinobactéries productrices d'antibiotiques. La souche a été reprise par Boubetra (2013), pour l'étude taxonomique détaillée de la souche. De fait, la souche produit un mycélium aérien blanc jaunâtre, un mycélium du substrat brun rougeâtre, brun jaunâtre, brun ou jaune vif selon les milieux et ne produit pas de pigment soluble. Elle présente un mycélium aérien à filaments ramifiés qui se fragmentent totalement et de manière anarchique (souvent en zig-zag), en de longues chaînes de spores en bâtonnets ou ovoïdes (Figure 6) et non mobiles alors que le mycélium du substrat se fragmente assez peu (Boubetra, 2013). L'étude physiologique montre que la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 est capable de dégrader la caséine, l'esculine et la gélatine, le Tween 80 et la tyrosine. Elle dégrade par ailleurs, le fructose, le glucose, le saccharose, le cellobiose et le ribose, l'alanine et la proline, et également les sels de sodium, l'acétate, le propionate, le pyruvate et le succinate (Boubetra, 2013).

Elle a fait l'objet d'une étude par Boubetra *et al.* (2013b) pour l'identification de trois molécules antibiotiques et d'une autre taxonomique l'ayant caractérisée comme nouvelle espèce nommée *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., avec SA198^T (=DSM 45947^T5 = CECT 8640^T) en tant que souche type (Boubetra *et al.*, 2015).



Figure 6. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 (Boubetra, 2013).

2. Potentiel producteur d'antibiotiques de la souche

La production d'antibiotiques par la souche *Sx. tamanrassetensis* étudiée par Boubetra, (2013) révèle que celle-ci sécrète des activités à la fois antibactériennes (Gram positif et Gram négatif) et antifongiques (champignons filamenteux). Dans le milieu ISP2, les antibiotiques sécrétés par la souche SA198 sont extraits par le dichlorométhane. La révélation microbiologique par bioautographie a mis en évidence une tache notée A, de couleur jaune foncé à l'œil nu, fortement active contre *Bacillus subtilis* et *Umbelopsis ramanniana* et modérément active contre *Aspergillus carbonarius*. Ces deux zones peuvent correspondre chacune à un seul ou à plusieurs antibiotiques. Le produit A est sécrété totalement dans le filtrat de culture, contrairement au produit B qui reste à l'intérieur du mycélium. Plusieurs auteurs ont montré que les antibiotiques extracellulaires sont les mêmes que ceux qui sont internes (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007).

Le produit A étant le plus actif et majoritaire a fait l'objet de purifications par HPLC. Le profil de la première injection a montré 12 fractions dont 7 actives. Les composés A4 (temps de rétention = TR = 18,7 min), A5 (TR = 21,8 min) et A5.1 (TR = 20,8 min), de couleur jaune très vif, sont les plus actifs, aussi bien sur les bactéries que sur les champignons. Ces trois composés ont été caractérisés par des méthodes physico-chimiques et spectroscopiques (UV-visible, infrarouge, spectrométrie de masse, RMN du proton et du carbone 13) et leurs structures chimiques déterminées (Figure 7) (Boubetra, 2013). Les antibiotiques A5 et A5.1 sont des isomères de position et possèdent un CH₂ en plus par rapport à A4. Ce sont des composés qui contiennent deux cycles (dont l'un possède un groupement époxy) et deux chaînes insaturées non cycliques. Ces trois molécules ont

été comparées à celles déjà décrites dans la littérature, mais aucune ressemblance n'a été trouvée, ce qui a permis de les considérer comme étant de nouveaux antibiotiques (Boubetra, 2013).

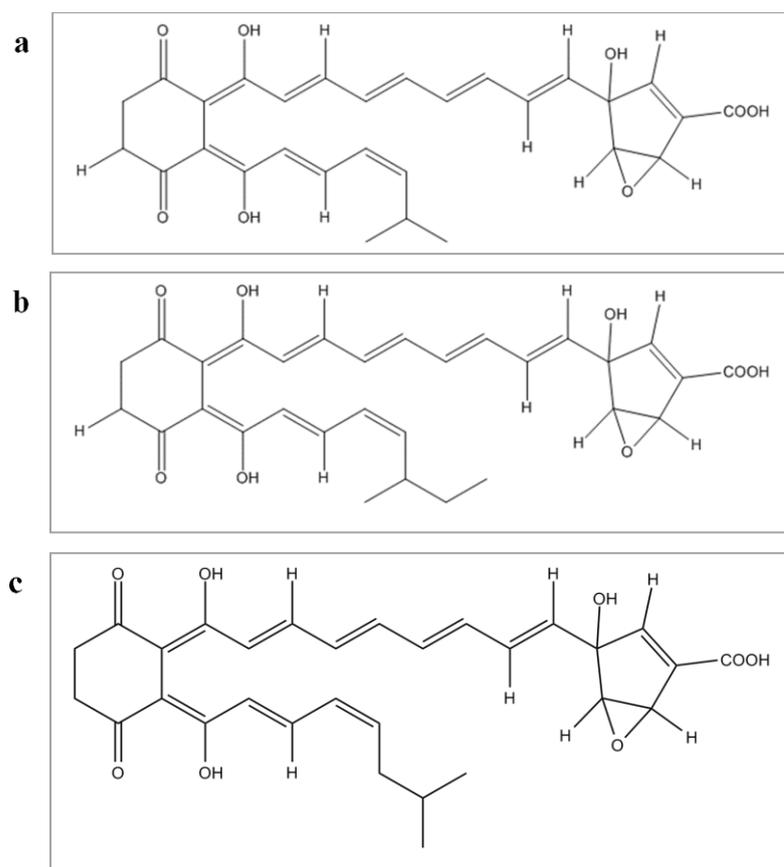


Figure 7. Structures des antibiotiques A4 (a), A5 (b) et A5.1 (c) sécrétés par *Saccharothrix tamanrassetensis* SA 198 (Boubetra, 2013).

IV. INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES PAR LES ACTINOBACTERIES MYCELIENNES

La production d'antibiotiques se produit généralement pendant la phase de croissance tardive du microorganisme producteur ou durant l'idiophase. Ce processus de production de métabolites secondaires dépend fortement de la croissance du microorganisme et des paramètres nutritionnels (Gonzalez *et al.*, 2003; Jose *et al.*, 2013; Kavitha et Savithri, 2017). La nature des antibiotiques produits par les actinobactéries dépend de l'espèce, de la souche et des conditions de culture telles que l'inoculum, le pH, le temps d'incubation, et la nature des sources de carbone et d'azote (Amin *et al.*, 2020).

Il est admis que le moment où s'initie la production est certainement d'ordre génétique mais là encore cette expression peut être grandement influencée par des facteurs environnementaux et physicochimiques incluant les nutriments (particulièrement la limitation en sources de carbone, azote et phosphate). Ainsi, la synthèse des antibiotiques est souvent provoquée par l'épuisement d'un nutriment, l'ajout d'un inducteur et / ou par une diminution du taux de croissance (Bibb *et al.*, 2005). Ces événements génèrent des signaux qui provoquent une cascade d'événements de régulation sur les producteurs d'antibiotiques microbiens entraînant une différenciation chimique et morphologique (morphogénèse) (Sanchez *et al.*, 2010; Genilloud, 2018).

Pour augmenter les chances de synthèse de nouveaux métabolites bioactifs un certain nombre de nouvelles approches ont été développées telle que la stratégie dite, "Une souche à plusieurs composés" pour "One strain many compounds" (OSMAC). Cette démarche est un moyen simple et un outil puissant pouvant activer de nombreux groupes de gènes silencieux pour aboutir à des produits bioactifs naturels. La méthodologie OSMAC, intervient à plusieurs niveaux comme ; la composition du milieu et les conditions de culture, la mise en place de co-culture avec d'autres souches, l'ajout d'inhibiteur(s) enzymatique(s) ou de précurseur(s) biosynthétique(s) de métabolites secondaires (Pan *et al.*, 2019).

D'autres part, les cultures liquides, de microorganismes filamenteux telles que les actinobactéries sont soumises à une pression hydrodynamique induisant un effet certain sur la production d'antibiotique. Le principal inconvénient de telles cultures est que leurs conditions ont un impact sur les réponses physiologiques des microorganismes outre la production de métabolites, la croissance, la morphologie ou la consommation de nutriments (Strub, 2008; Mehmood, 2011) Ainsi, l'inoculum, la composition du milieu de culture, plus particulièrement la source de carbone, d'azote et de phosphate, les métaux, la concentration en dioxygène et en dioxyde de carbone dissous, le pH, la température et les forces mécaniques sont quelques exemples de facteurs importants à considérer pour la production d'antibiotiques en bioréacteur (Strub, 2008; Haj-Husein, 2013).

1. Facteurs nutritionnels

1.1. Effet de la source de carbone

La source de carbone est un des facteurs nutritionnels les plus importants qui influence le métabolisme des microorganismes. Elle constitue généralement la majeure partie d'un milieu de culture, ce qui en fait l'objet de nombreuses études sur l'optimisation de la production d'antibiotiques. Lors d'une culture microbienne, les sources de carbone simplement ou rapidement métabolisables tel que le glucose ou le fructose, sont préférés aux autres sources de carbone plus

complexe. Une fois que la source carbonée rapidement métabolisable est épuisée dans le milieu, il se produit un phénomène de répression catabolique inhibant généralement la production de nombreux antibiotiques (Escalante *et al.*, 2015). Habituellement, le glucose est une excellente source de carbone pour la croissance mais il interfère avec la formation de nombreux antibiotiques « trop de bonnes choses peuvent s'avérer mauvaises » (Demain, 1989). Plusieurs travaux rapportent l'effet négatif sur la production de métabolites secondaires qu'aurait l'utilisation du glucose seul. C'est le cas de la production d'oleandomycine avec 27,5 mM de glucose (Vilches *et al.*, 1990), d'avilamycine (Zhu *et al.*, 2007) et de spiramycine (Lounes *et al.*, 1996) pour une concentration en glucose supérieure à 20 g/L, de nystatine avec 1 M de glucose (Jonsbu *et al.*, 2002), de néomycine avec 10 g/L de glucose (Vastrad *et al.*, 2011). Dans de nombreux cas, il a été rapporté que le glucose inhibe la synthèse de certaines enzymes, y compris celles qui seraient impliquées directement ou indirectement dans la biosynthèse des métabolites secondaires. Par exemple, le glucose a un effet négatif sur l'action de la phénoxazinone synthétase et de la N-acétyl kanamycine amidohydrolase, deux enzymes des voies de biosynthèse de l'actinomycine et de la kanamycine, respectivement (Galo et Katz., 1972; Satoh *et al.*, 1972). En revanche il a été rapporté que dans le cas des milieux de culture contenant des mélanges de sources de carbone rapidement et lentement utilisées, la source simplement métabolisable serait utilisée en premier afin de produire des cellules, mais peu ou pas d'antibiotiques. Puis, après l'épuisement des composés rapidement assimilés, la seconde source de carbone serait utilisée afin de former cette fois les idiolites.

Cependant, nombre de publications ont montré la relation étroite qui lie la production optimale d'agents antimicrobiens au type et à la concentration des sources de carbone présentes dans le milieu de culture tels que (l'amidon, le glucose, le maltose, le fructose, le glycérol et la mélasse) (Pharm, 2010; Taurino *et al.*, 2011; Abdelwahed *et al.*, 2012; Amin *et al.*, 2017a; Amin *et al.*, 2017b; Wang *et al.*, 2017).

Enfin, des études sur des milieux de fermentation ont montré que les polysaccharides sont généralement les meilleures sources de carbone pour la production d'antibiotiques, car ils favorisent un taux de croissance lent, ce qui est souhaitable pour la production d'antibiotiques (Rafieenia, 2013). Le Tableau 2 reprend quelques exemples de sources de carbone utilisées dans des milieux de culture et les molécules antibiotiques produites par les souches de *Saccharothrix* utilisées dans ces différentes études.

1.2. Effet de la source d'azote

Comme pour le carbone, le choix de la source d'azote et de sa concentration dans le milieu joue également un rôle crucial dans la synthèse des métabolites et elle est à bien des égards un

facteur plus important que d'autres macro ou micro-nutriments pour la croissance cellulaire et la production de métabolites secondaires. Ainsi, l'utilisation d'acides aminés spécifiques peut augmenter la productivité dans certains cas et inversement, des acides aminés inappropriés peuvent inhiber la synthèse de métabolites (Marwick *et al.*, 1999). Par ailleurs, une concentration élevée de sources d'azote (tels que l'ammonium ou les acides aminés) dans le milieu réprime le métabolisme secondaire. Ce qui n'est pas le cas avec des milieux de fermentation complexes incluant aussi des protéines sous forme de sources d'azote. Pour exemple, la production de la streptomycine chez *S. griseus* qui a lieu dans des cultures de farine de soja avec la L-proline et une faible concentration de sels d'ammonium ou encore la production d'antibiotiques aminoglycosides, réprimée par les sels d'ammonium, tandis que le nitrate et certains acides aminés la stimulent (Shapiro *et al.*, 1989). Autre exemple de sources d'azote complexes, les polyamines omni présentes dans la nature, et qui ont été signalées comme étant neutralisées par les streptomycètes et où il a été rapporté que les concentrations présentes de polyaminiques étaient très importantes pour la survie, la maturation, la prolifération et finalement la production de métabolites secondaires y compris chez *S. coelicolor* (Krysenko *et al.*, 2017).

Enfin, des auteurs rapportent par ailleurs que des sources d'azote telles que le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le chlorure d'ammonium, la peptone, la farine soja, la farine d'haricot et l'extrait de levure ont une grande influence sur la production d'antimicrobiens par les actinobactéries (Amin *et al.*, 2017a; Amin *et al.*, 2017b; Ahmad *et al.*, 2017; Taurino *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017; Abdelwahed *et al.*, 2012).

Le Tableau 3 présente quelques sources d'azote utilisées par les souches du genre *Saccharothrix* pour la production d'antibiotiques.

Tableau 2. Exemples de sources de carbones ayant permis la production d’antibiotiques par différentes espèces de *Saccharothrix*.

Source de carbone	Molécule antimicrobienne	Microorganisme	Référence
Glucose 4 g/L	Thiolutine	<i>Saccharothrix</i> sp. SA 233	Lamari <i>et al.</i> , 2002a
Glucose 10 g/L	Valerylpyrrothine Isovalerylpyrrothine Formylpyrrothine Aureothricine	<i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137	Merrouche <i>et al.</i> , 2010
Glucose 5 g/L	MutactimycinePR Mutactimycine C	<i>Saccharothrix</i> sp. SA 103	Zitouni <i>et al.</i> , 2004
Glucose 4 g/L	D(-)-threo-chloramphenicol	<i>Saccharothrix</i> sp. PAL54	Aouiche <i>et al.</i> , 2012
Amidon Glucose 10 g/L Glycerol	Caerulomycine M Saccharopyrone Acide saccharonoïque Caerulomycine A	<i>Sx. xinjiangensis</i>	Babadi <i>et al.</i> , 2019
Glycerol 20 g/L	Saccharomicine A et B	<i>Sx. espanaensis</i>	Singh <i>et al.</i> , 2000
Fructose 10 g/L	Chloramphénicol	<i>Sx. longispora</i> PAL54	Hamza <i>et al.</i> , 2018
Arabinose 10 g/L		<i>Sx. longispora</i> PAL42	
Saccharose 10g/L Amidon 5 g/L	Macrolides pentaene, WH01 et WH02	<i>Sx. yanglingensis</i> Hhs.015	Li <i>et al.</i> , 2015

Tableau 3. Exemples de sources d'azotes ayant permis la production d'antibiotiques par différentes espèces de *Saccharothrix*.

Source d'azote	Molécule antimicrobienne	Microorganisme	Référence
Thréonine 2,5 g/L	Rebeccamycin Fluoroindolocarbazole A, B et C	<i>Saccharothrix aerocolonigenes</i> ATCC 39243	Lam et al., 2001
Peptone de soja 15 g/L	Adecypenol Aristeromycine Coformycine 2'-deoxyciformycine Adechlorine	<i>Saccharothrix. sp</i>	Bush et al., 1993
Soja 3 g/L Tourteau de colza 20 g/L	Ammocidines B, C et D	<i>Saccharothrix sp.</i> AJ9571	Murakami et al., 2009
Extrait de levure 4 g/L Extrait de malt 10 g/L	Composés A4 et A5	<i>Saccharothrix tamanrassetensis</i> SA198	Boubetra et al., 2013b
Peptone 2 g/L Extrait de levure 2 g/L Corn steep liquor 2,5 g/L	Caerulomycin M Saccharopyrone Acide saccharonoic Caerulomycin A	<i>Sx. xinjiangensis</i> Act24Zk	Babadi et al., 2019
Extrait de levure 2 g/L Peptone 2 g/L	Pentaene macrolides, WH01 et WH02	<i>Sx. yanglingensis</i> Hhs.015	Li et al., 2019

1.3. Effet de la source de phosphate

La biosynthèse de nombreux antibiotiques est très sensible à la présence de phosphore et dont la source préférée est le phosphate inorganique (Pi). Il a été rapporté que des concentrations élevées de phosphate, inhibaient la production de métabolites secondaires tout en favorisant la croissance des microorganismes ([Bibb, 2005](#)). Dans de nombreux cas, la synthèse d'antibiotiques commence après l'épuisement de la source de phosphate ([Martin, 2004](#)). Ainsi, une concentration de phosphate supérieure à 10 mM supprime la biosynthèse des antibiotiques chez la plupart des microorganismes ([Lounes et al., 1996](#)). Pour exemple, l'addition de quantités supplémentaires de phosphate inorganique suppriment la biosynthèse de l'actinomycine et de la tétracycline ([Doull et](#)

Vining., 1990), ou encore, la biosynthèse de l'actinorhodine, la tétracycline et l'actinomycine, la candidine, la spiramycine, l'avilamycine, l'animomycine (Rafieenia, 2013).

1.4. Effet des éléments minéraux et des oligoéléments

Outre l'impact de la nature des sources de carbone et d'azote, plusieurs travaux ont démontré l'implication d'autres nutriments à de faibles concentrations (environ 10^{-7} M) dans le processus du métabolisme secondaire. Il s'agit des éléments minéraux comme le magnésium, le potassium et les oligoéléments essentiellement le fer, le cobalt, le nickel, le cuivre, le zinc, le molybdène, et le manganèse (Larpen et Sanglier, 1989; Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992). Par exemple, on a observé que la perturbation de l'homéostasie du zinc et du fer influait sur le métabolisme secondaire, et les effets sur la production de métabolites secondaires pouvaient exercer un effet indirect de stress physiologique (Genilloud., 2017). De manière constante, ces dernières années, la modification des concentrations en oligo-éléments dans les milieux de culture, a abouti à la découverte de nouveaux métabolites secondaires (Romano *et al.*, 2018).

2. L'inoculum

L'inoculum représente l'ensemble de la biomasse (spores, cellules, hyphes) nécessaire pour ensemer un milieu de culture de production de métabolites secondaires (Delaunay *et al.*, 2003). Par ailleurs, le succès de toute production biotechnologique est étroitement relié à la qualité et à la quantité de l'inoculum de départ, de ce fait afin d'en garantir le succès, il convient d'assurer sa pureté et sa stabilité (Larpen et Sanglier, 1989; Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992). Aussi il est à parfaitement maîtriser.

- Le choix de l'inoculum : les spores en cryotubes (dénombrées) conservées à -20°C seront préférées aux tapis de spores sur boîte de Pétri.

- L'âge de l'inoculum : plus il est âgé (plus de 4 jours), plus la phase de latence est longue et la production de métabolite secondaire affectée.

- Le nombre de générations : les actinobactéries possèdent un haut pourcentage en bases G et C dans leur ADN ce qui les rend plus sujettes aux mutations spontanées, le taux estimé chez les bactéries en général varie entre 10^{-3} à 10^{-20} . De ce fait, le nombre de générations de l'inoculum doit être minimisé pour éviter de perdre partiellement ou même totalement, la capacité de synthèse de l'antibiotique.

3. Les facteurs physico-chimiques

Lors de la caractérisation taxonomique de microorganismes nouvellement isolés, il est courant de rechercher les conditions de croissance optimales, notamment en fonction de la température, la salinité et du pH. Ces facteurs environnementaux ajoutés à l'activité de l'eau (A_w), au potentiel d'oxydoréduction ou à d'autres qui ne concernent pas directement la composition en nutriments du milieu, lorsqu'ils ne sont pas maîtrisés, peuvent avoir des effets négatifs sur la dynamique de croissance des bactéries ainsi que sur la production de métabolites secondaires.

3.1. Effet du pH

La valeur du pH initial ainsi que son évolution dans le milieu durant le processus de fermentation influent grandement sur la production des métabolites secondaires. En effet, il a été rapporté dans certaines études que la gamme de pH optimale pour la production de métabolites antimicrobiens par les actinobactéries est de 6-7 (Pharm, 2010; Hamid *et al.*, 2015; Amin *et al.*, 2017b; Ahmad *et al.*, 2017; Amin *et al.*, 2018), selon les souches. Pour exemple, la production de granaticine est maximale lorsque le pH initial du milieu de culture est ajusté entre 6,5 et 7,0 (James *et al.*, 1991). De même, la production maximale d'antibiotiques par *Streptomyces albovinaceus* a été observée à un pH de 7,2 et le pH optimal pour la production d'oxytétracycline était de 7,0 (Borenstajn et Wolf., 1955; Abdelghani, 2011). De même, les travaux de Boubetra (2013) sur la souche *Saccharothrix* sp.SA198 montrent que la production de l'activité antibiotique est meilleure à pH 7. Toutefois, un pH basique est privilégié pour la production d'autres antibiotiques tel que la kanamycine par *Streptomyces kanamyceticus* (Pringsulaka *et al.*, 1999) ou encore l'activité antibactérienne de *Saccharothrix algeriensis* en milieu semi synthétique qui a lieu à des pH compris entre 7.8 et 8.2 (Merrouche *et al.*, 2012).

3.2. Effet de la température

La température affecte le taux de croissance ainsi que les réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse de nombres de métabolites (Haddar *et al.*, 2007). Les températures optimales permettant une synthèse des antibiotiques sont généralement plus basses que celles permettant la croissance (Larpent et Sanglier, 1989). Toutefois, une production maximale d'antibiotiques peut se produire à une température identique ou différente. Ainsi, l'étude menée par Boubetra (2013) montre que les souches de *Saccharothrix saharensis* et *Saccharothrix hoggarensis* possèdent une gamme assez large de températures de croissance, entre 20 et 45°C avec un optimum de production à 30°C. De manière similaire, la meilleure température pour la production de néomycine, de

kanamycine et d'anicomycine par *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces kanamyceticus* et *Streptomyces griseolus* est de 30°C (Rafieenia, 2013). La souche *Sx. tamanrassetensis* croit à une température de 37°C mais pas à 45°C (Boubetra, 2013).

3.3. Effet des conditions hydrodynamiques

Lors de mise en culture sur bioréacteur, les biocatalyseurs (microorganismes, cellules) sont soumis à un environnement hydrodynamique, ayant un rôle important sur la réponse physiologique conditionnée par le microenvironnement biochimique et physique qu'ils rencontrent à un temps donné au sein du bioréacteur (Haj-Husein, 2013). Ce rôle est d'autant plus marqué dans le cas de morphologies spécifiques (filaments, enchevêtrements ou pelotes) telle que les actinobactéries.

Les actinobactéries en cultures impliquent une forte demande en oxygène tout comme elles sont parmi les microorganismes les plus sensibles aux conséquences de l'hydrodynamique. De fait, l'agitation de tels systèmes, engendre la mise en mouvement du liquide ce qui influence donc le transfert de matière (oxygène, substrats organiques), le transfert de chaleur, les caractéristiques de macro- et micro-mélange ainsi que les temps de circulation (Mehmood, 2011).

Les effets hydrodynamiques engendrés par les systèmes d'agitation et d'aération impactent la croissance et par conséquent affectent la production d'antibiotiques (Akhurst, 1982; Chen *et al.*, 1996). Ces effets peuvent être caractérisées par un ensemble de paramètres mesurables tels que : coefficient de transfert en oxygène, concentration en substrats, puissance dissipée volumique, vitesse en bout de pale, flux de transfert de substrats de la phase liquide au biocatalyseur. Leur détermination peut contribuer à élucider ou comprendre le déclenchement du processus de production des métabolites (Mehmood, 2011; Haj-Husein, 2013).

Il est donc essentiel de pouvoir relier la physiologie du microorganisme telle que la production d'antibiotiques (déclenchement et concentration) à l'environnement hydrodynamique en associant les grandeurs macroscopiques d'agitation et d'aération du bioréacteur à la réponse physiologique. Ainsi, Mellouli *et al.* (2004) rapportent que pour la souche de *Streptomyces* TN58, qui produit cinq molécules bioactives différentes, la meilleure production est obtenue à une agitation comprise entre 200 et 250 rpm. En revanche, pour des agitations faibles de l'ordre de 100 rpm ou fortes au voisinage de 300 rpm, la production de biomolécules baisse considérablement. Pour autant, l'augmentation de la vitesse d'agitation provoque aussi un accroissement des forces de cisaillement auxquelles vont être soumis les microorganismes filamenteux. Ces forces engendrent une fragmentation du mycélium qui mènent souvent à l'apparition de structures plus compactes (Ohta *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 1997). Dans le cas de la souche *Sx. tamanrassetensis*, une agitation de

250 rpm et un flux continu d'air avait permis l'obtention et la caractérisation de trois molécules antibiotiques originales [Boubetra, \(2013\)](#).

3.4. Effet du temps d'incubation

L'évolution de la production des antibiotiques en fonction du temps est un facteur déterminant. Chez les actinobactéries du genre *Saccharothrix*, elle est variable d'une espèce à une autre. A titre d'exemple, la production des biomolécules (PSA, PSB et PSC2) par la souche *Saccharothrix algeriensis* commence après 2 jours d'incubation à 28°C pour atteindre un maximum après 4 jours ([Lamari et al., 2002a](#)). Cependant, pour la souche *Saccharothrix* sp. SA 103, qui produit un métabolite antibactérien actif contre *B. subtilis*, la production commence dès le premier jour d'incubation pour atteindre un maximum le 4^{ème} jour ([Zitouni et al., 2004a](#)).

V. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES

Le terme « optimisation » a été initialement utilisé dans la chimie analytique pour désigner un ensemble d'expériences permettant de développer une méthode qui, lorsqu'elle est appliquée, donne la ou les meilleure(s) réponse(s), fournissant ainsi des conditions avec une plus grande sensibilité, précision et exactitude, ainsi que des limites basses de détection et de quantification, etc. ([Bezerra et al., 2018](#)). Ce terme ou cette application ont depuis le début des années 1980 été appliqués aussi aux domaines alimentaires et pharmaceutiques, où l'optimisation a ciblé l'augmentation du rendement et de l'activité du produit souhaité ([Singh et al., 2017](#)). Dans le domaine des antibiotiques, de nombreux efforts ont été déployés pour optimiser les taux de production et orienter la gamme de produits ([Wang et al., 2011](#)).

Il existe différentes méthodes d'optimisation fréquemment utilisées pour améliorer l'efficacité du support de production. Traditionnellement, l'optimisation est réalisée en surveillant l'influence d'un facteur à la fois sur une réponse expérimentale donnée. Il s'agit d'une méthode non statistique nommée plus couramment approche à un facteur (one-factor-at-a-time, OFAT) ([Frey et al., 2003](#)). D'autres méthodes sont actuellement plus en phase avec les besoins biotechnologiques du moment, et qui sont de conception expérimentale statistique ([Singh et al., 2011](#); [Sharma et Singh, 2012](#); [Ramakrishnan et al., 2013](#)). La première méthode est très laborieuse et prend beaucoup de temps en comparaison des méthodes statistiques ([Adinarayana et al., 2003](#)). Par conséquent, si l'on devait citer des exemples de tests de robustesse statistique ce serait : la conception factorielle complète à deux niveaux, le Plackett-Burman design, la Méthodologie de Surface des Réponses, le Box Behnken design et le central composite design, qui sont des méthodes largement utilisées pour

sélectionner les facteurs variables et obtenir leurs niveaux optimaux (Wang *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2018; Lee, 2019). La Figure 8 est un schéma reprenant les différentes techniques utilisées dans le domaine de l'optimisation d'un milieu de production.

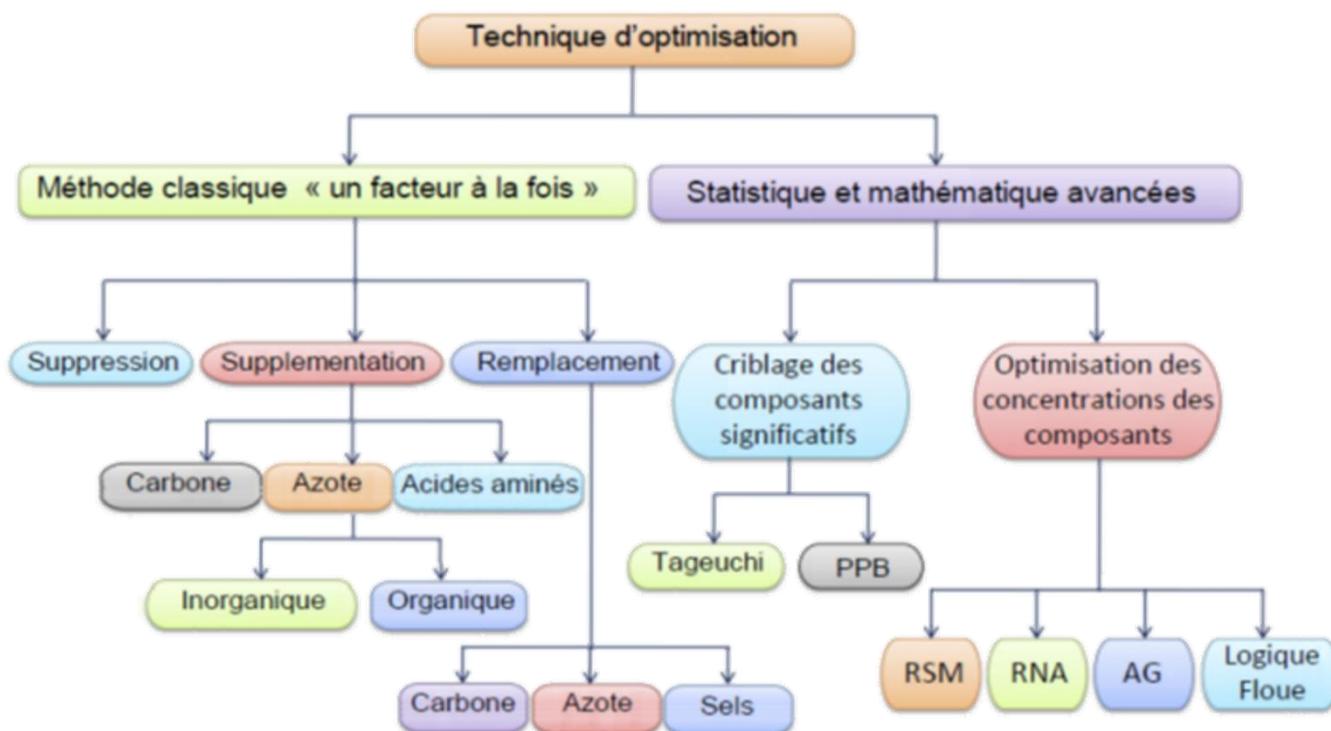


Figure 8. Schéma reprenant les principales méthodes de recherche utilisées en optimisation (Singh, 2017). PPB, Plan Plackett-Burman ; RSM, Méthodologie de surface de réponse ; RNA, Réseaux de neurones artificiels ; AG, Algorithmes génétiques.

Avant de développer quelques exemples de plans d'expériences classique et notamment ceux utilisés lors de nos travaux, nous abordons une série de termes usuels et autres notions de base fréquemment utilisées dans la suite.

Terminologie (Goupy, 1999 ; Goupy, 2005)

- **La réponse** : grandeur de sortie ou grandeur étudiée désignée par y (la grandeur mesurée à chaque essai). C'est le résultat d'une expérience, par exemple la quantité d'antibiotique produit.
- **Les facteurs** : ou variables sont des termes équivalents et désignés par C_i ; il s'agit de grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensées influencer sur les variations de la réponse. Autrement dit, le facteur désigne tout paramètre pouvant influencer sur la réponse expérimentale (par exemple les constituants du milieu de culture, les conditions physico-chimiques, etc.).
- **Niveau** : valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai.

- **Variables codées** : le traitement par logiciel des données issues des plans d'expériences, exige l'utilisation de variables centrées, réduites et sans dimension, appelées « variables codées » et désignées par X_i . Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas (-1). La borne supérieure est le niveau haut ($+1$) et la borne médiane (0) le point central (Figure 9).
- **Domaine d'étude** : on l'appelle aussi domaine expérimental. Il est délimité par les niveaux inférieurs et supérieurs des facteurs étudiés. Les niveaux X_1 et X_2 de deux facteurs 1 et 2 peuvent être considérés comme les coordonnées d'un point de l'espace expérimental. Une expérience donnée est alors représentée par un point dans ce système d'axes (Figure 10).
- **Plan d'expérimentation** : Une expérience donnée est représentée par un point dans ce système d'axes et un ensemble de points expérimentaux représente un plan d'expériences (Figure 11).
- **Matrice d'expériences** : c'est la matrice qui rassemble tous les niveaux pris par toutes les variables codées pour les différentes expériences à réaliser dans le cadre du plan choisi.
- **Notion de surface de réponse** : La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs nécessite un espace à trois dimensions pour être représenté : deux dimensions pour les facteurs X_1 et X_2 et une dimension pour la réponse y . A chaque point (points expérimentaux) du domaine d'étude correspond une réponse y . A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 12).

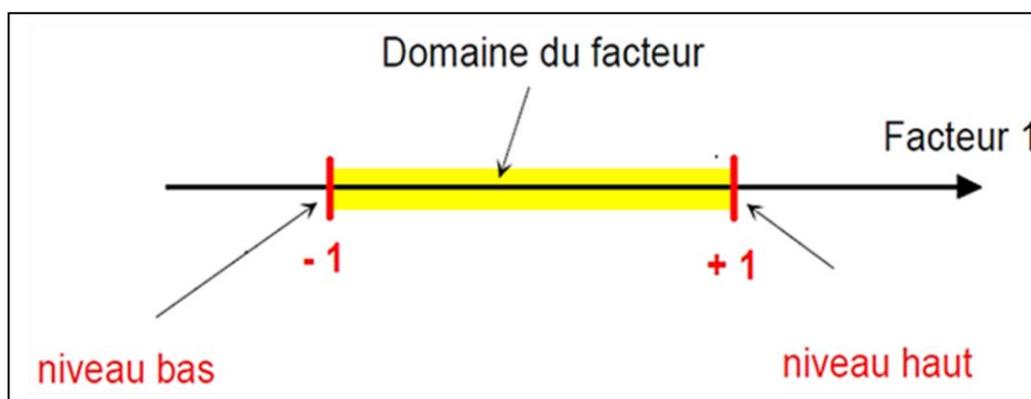


Figure 9. Domaine de variation du facteur. Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas (-1) et le niveau haut ($+1$) (Goupy, 2006).

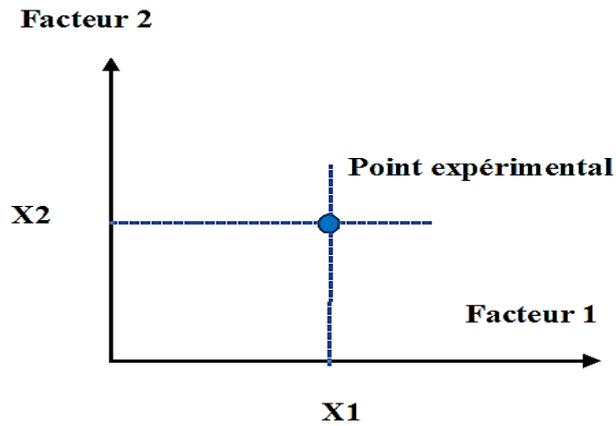


Figure 10. Niveaux des facteurs définissant les points expérimentaux (Goupy, 2006).

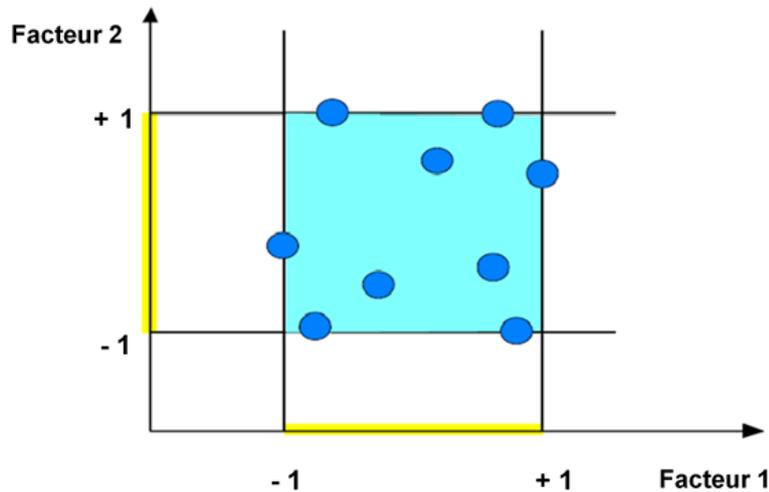


Figure 11. Points expérimentaux du domaine d'étude défini par l'expérimentateur (Goupy, 2006). Les 2 traits jaunes désignent les domaines d'étude ; la surface bleu turquoise est le domaine de réponse et les petits ronds bleus sont les points expérimentaux.

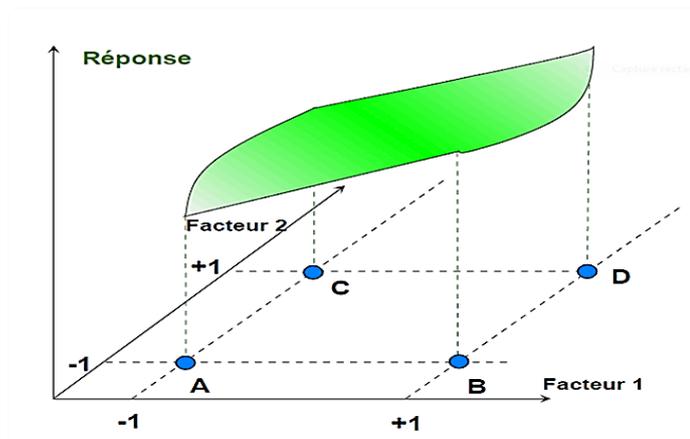


Figure 12. Les réponses associées aux points du domaine d'étude formant la surface de réponse. Les quelques réponses mesurées aux points du plan d'expériences permettent de calculer l'équation de la surface de réponses (Goupy, 2006).

1. Méthode “one factor-at-a-time”

La technique classique d'optimisation du milieu dite « une variable à la fois » ou OFAT pour « one-factor-at-a-time », consiste en la mise en œuvre d'expériences impliquant de tester un seul facteur ou variable à la fois au lieu de plusieurs simultanément. Le facteur étudié étant modifié, les autres sont maintenus à un niveau constant. Cette méthodologie est particulièrement utilisée au cours des premières étapes d'investigation du milieu de production telle que la sélection des sources de carbone et d'azote (Zitouni *et al.*, 2004; Khebizi *et al.*, 2017). Cette méthode présente des désagréments : En effet, elle n'inclut pas les effets interactifs entre les variables étudiées, elle ne décrit pas les effets complets du paramètre sur la réponse et enfin elle génère souvent une augmentation du nombre d'expériences nécessaires pour mener la recherche, ce qui porte des conséquences aussi sur le temps et le coût (augmentation de la consommation de réactifs et matériaux) (Bezerra *et al.*, 2008).

2. Méthodes statistiques d'optimisation

Il y a quelques années, l'utilisation de la puissance de calcul de l'outil informatique a très vite été généralisée dans de nombreux domaines de recherche, notamment pour la gestion des procédés expérimentaux. Cette révolution technique ainsi que les méthodes numériques de calcul ont favorisé l'usage des '*simulations*', et de manière plus large des '*modélisations*' numériques.

A chaque système réel étudié existe un équivalent virtuel dont les qualités sont plus avantageuses. En effet, l'intérêt de cette approche est que le système peut être modifié au gré de l'expérimentateur. Cette démarche est particulièrement appliquée lors des '*optimisations*' pendant lesquelles les caractéristiques des modélisations sont modifiées afin d'améliorer certaines grandeurs.

Le recours aux outils informatiques s'inscrit donc dans la volonté de limiter le plus possible les coûts (financiers et temporels) liés à la conception et à l'optimisation, ainsi que dans l'amélioration des performances d'un système, d'un processus ou d'un produit afin d'en tirer le maximum d'avantages (Bezerra *et al.*, 2018).

Au cours des dernières années, le nombre de travaux utilisant ces conceptions multivariées dans le développement de méthodes analytiques a augmenté, car ils sont plus économiques et efficaces, en plus de permettre l'optimisation simultanée des variables étudiées et avec une plus grande efficacité par rapport à la stratégie univariée traditionnelle (Callao, 2014).

Le domaine de l'amélioration de la production des antibiotiques a pleinement bénéficié de cette évolution technique (Myers *et al.*, 2016; Brown, 2017). Pour la recherche des conditions

optimales de production des antibiotiques (en fioles d'Erlenmeyer ou en bioréacteur), une bonne connaissance, une maîtrise et un contrôle des divers paramètres est nécessaire. Les contraintes pratiques et de coûts incitent fortement à recourir au prototypage virtuel pour la conception optimisée de nouveaux milieux de culture. L'objectif conceptuel étant d'obtenir un taux de production réel satisfaisant dès la première fermentation. Bien que le recours à l'optimisation et à la formulation du milieu de production soit pratiqué depuis des décennies, il s'agit toujours d'un des phénomènes les plus étudiés pour la production de nombreux métabolites (Ferreira *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2018; Lee, 2019).

2.1. Les plans d'expériences

La démarche des chercheurs en biotechnologies vise souvent à améliorer leurs produits ou encore les performances de leurs processus de production en conduisant une multitude d'expériences. Cependant, la mise au point et la réalisation de tels procédés peut s'avérer souvent coûteuses et peu performantes sans compter la difficulté d'exploiter un nombre élevé de résultats. Afin de surmonter ces difficultés, de nombreux chercheurs adoptent la méthode de planification des expériences.

Les plans d'expériences sont des méthodes mathématiques et statistiques appliquées à l'expérimentation qui permettent d'organiser au mieux des essais (expériences) afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expériences se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats (Norme ISO 3534-3). Le principal avantage du recours aux plans d'expériences est le fait de définir une stratégie où un grand nombre de facteurs sont intégrés, d'obtenir un maximum de renseignements et de résoudre le problème en ayant réalisé le minimum d'expériences. Ces objectifs peuvent être atteints par étapes successives, chaque étape constituant une série homogène d'expériences qui forment une matrice d'expériences (Box *et al.*, 1978; Box *et al.*, 2005).

La solution proposée consiste à établir un modèle exprimant la réponse (la solution) en fonction des facteurs. Pour bâtir ce modèle, il faut appréhender ces variations. Celles-ci sont déduites des résultats de séries d'expériences, c'est-à-dire de plusieurs configurations pour lesquelles les valeurs des facteurs sont différentes. C'est la notion de plan d'expériences qui correspond à la réalisation d'une série de N expériences, qui sont toutes déterminées à priori, réalisables et indépendantes entres-elles. Ainsi, la réalisation d'un plan revient à déterminer la valeur de la fonction réponse pour ces N configurations. Une relation de modélisation en est alors déduite.

Suivant le type des modèles mathématiques, l'expérimentateur pourra déduire des informations plus ou moins précises, qualitatives et quantitatives.

Les deux principales applications possibles de la 'méthode des plans d'expériences' sont : (a) les techniques de '*screening*' destinés à étudier (estimer et comparer) les effets des paramètres, et (b) les plans pour régler les paramètres afin d'atteindre un optimum et qui reposent sur la méthodologie des *surfaces de réponse*.

- La technique du '*screening*'

Cette analyse permet de déterminer parmi les facteurs recensés par l'expérimentateur, ceux qui ont une influence statistiquement non négligeable sur les variations de la réponse. C'est une étude purement qualitative du système puisqu'on cherche à déterminer les facteurs en fonction desquels la réponse varie.

- La méthodologie des *surfaces de réponse*

Les variations de la réponse sont calculées en fonction des facteurs influents identifiés précédemment lors du *screening*. Cette étude est quantitative. Le but étant de déterminer comment la réponse varie. Le calcul des surfaces de réponse peut servir à la détermination des conditions optimales, ou bien initier un processus plus complexe d'optimisation.

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. De nombreux outils mathématiques sont mis au point afin de faciliter l'analyse des résultats des plans d'expériences. Les plus utilisés seront présentés ci-dessous.

2.2. Les logiciels statistiques

Lors d'une optimisation ou de calcul d'un plan d'expériences, de nombreux calculs mathématiques sont nécessaires. Leur réalisation s'avère fastidieuse et très coûteuse en temps, et peut également être source d'erreurs. L'intérêt de l'outil statistique réside dans le fait que toutes les procédures de calcul dans les plans d'expériences et l'optimisation par plans d'expériences, reposent sur la réalisation d'expériences virtuelles (simulations) ou de calculs mathématiques effectués par ordinateur. Des logiciels statistiques comme Minitab, Statistica, Matlab, StatSoft, etc. sont donc conçus pour faciliter au maximum la réalisation de ces différentes opérations, en assurant l'automatisation complète des calculs des plans d'expériences et des processus d'optimisation.

Minitab est un logiciel statistique conçu, à l'origine, par le Département de Statistiques de l'Université de Pennsylvanie (U.S.A.) de la société (Minitab Inc., State College, PA, USA). Il permet d'analyser des données dans le cadre de projets d'amélioration de la qualité des processus. Il est particulièrement adapté à l'analyse statistique de petits Tableaux de données bien structurés : plans d'expériences, analyse de la variance, méthodes relatives à la corrélation et à la régression

simple et multiple, tests d'indépendance, analyse en composantes principales, contrôle statistique de la qualité, etc. L'interface graphique WINDOWS apporte à ce logiciel une plus grande souplesse d'utilisation et une meilleure présentation des résultats.

Minitab propose nombre de fonctionnalités régulièrement améliorées et adaptées aux besoins des expérimentateurs ([Minitab handbook, 2001](#)).

- La conception de plans d'expériences
- La mise en œuvre d'analyses statistiques et de procédures
- L'exploration des données avec graphiques
- L'évaluation de la qualité

Le logiciel Minitab permet de réaliser les calculs suivants

- Les plans d'expériences de screening

Minitab offre la possibilité d'appliquer de nombreux plans de screening. Cela comprend principalement ; les plans de Plackett-Burman, les plans de Taguchi, les plans factoriels complets et les plans fractionnaires.

- Les plans d'expériences de Response Surface Methodology (RSM)

De la même manière, Minitab propose un choix de plans d'expériences de RSM pouvant être calculés automatiquement. Il s'agit des plans Box-Behnken, les plans composites centraux, les plans de Doehlert, etc.

Une fois les calculs (plans d'expériences, optimisation) terminés, les résultats numériques sont alors analysés. Le traitement des données chiffrées peut être illustré par des représentations graphiques et des équations générées par le logiciel Minitab.

2.3. Les techniques du screening « Plackett-Burman Design »

L'optimisation de tous les facteurs (composants et paramètres) dont dépend une production, qu'ils soient significatifs ou non, prend du temps et coûte cher. Il convient donc de détecter et retenir uniquement les facteurs dignes d'intérêt, dont dépendra la suite de l'optimisation. La technique du screening (mot anglosaxon qui désigne le criblage) est un test statistique de sélection qui permet de déterminer, parmi un ensemble initial de facteurs, ceux qui sont influents ([Benoist, 1994](#); [Schimmerling, 1998](#)). Il s'agit d'une étape essentiellement qualitative puisqu'elle permet d'identifier les facteurs ayant une influence significative sur le fonctionnement d'un procédé (exemple la production optimale d'antibiotiques). La technique du screening constitue une étape importante avant toute analyse plus « fine » ultérieure, pouvant être notamment assurée par la méthodologie des surfaces de réponses.

Parmi les méthodes statistiques assurant la fonction de screening, les plans de Taguchi et les plans de Plackett-Burman (PBD) sont les plus utilisés.

Les plans de Taguchi sont issus des travaux du Dr Genichi Taguchi, et ont été développés dans une optique d'utilisation industrielle. Ce sont en fait des plans factoriels fractionnaires, prenant en compte certaines interactions jugées importantes (Garcia, 1995).

Le 'Plackett-Burman Design' (PBD) est une méthode qui fait référence au travail original réalisé en 1946 par Plackett et Burman, où ils ont présenté des plans expérimentaux pour étudier la dépendance d'un facteur mesuré à un certain nombre d'autres variables indépendantes (Plackett et Burman, 1946). Il s'agit donc d'identifier les facteurs importants qui affectent les résultats de l'expérience (Chen *et al.*, 2002). Par ailleurs, ce test statistique permet de réduire le nombre de facteurs à optimiser par la suite et de ce fait, gagner du temps et de l'argent. L'emploi de ce type de plan réduit considérablement le nombre d'expérimentations générées.

Les matrices de calcul des plans de Plackett et Burman sont en fait des matrices d'Hadamard (Benoist, 1994; Dreesbeke, 1997), c'est-à-dire des matrices ayant 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 lignes, etc. dans un Tableau expérimental. Le plan repose sur des matrices carrées dont les éléments sont soit (-1) soit (+1) et dont le nombre de lignes (ou de colonnes) est multiple de 4. Cela permet d'analyser jusqu'à (n-1) variables dans au moins n expériences où n est un multiple de 4. Pour exemple un modèle PBD avec n = 12 est conçu comme indiqué dans le Tableau 4.

Tableau 4. Plan Plackett-Burman pour matrice à n = 12.

Essai	Variables (n-1=11)										
n=12	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
6	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1
7	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
8	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1
9	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
11	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
12	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1

Les facteurs des plans de Plackett et Burman sont généralement des plans à 2 niveaux et il n'y a pas de point central car on ne cherche pas à modéliser les résultats (Goupy, 2005). La conception des matrices permettant de fournir les conditions de chaque expérience ou test est rapide et simple du fait que cela est directement généré via des logiciels statistiques tel qu'ELLIPSE, Design expert, Minitab, etc.

Le plan Plackett-Burman a été appliqué par plusieurs chercheurs pour sélectionner des facteurs d'influence parmi les constituants d'un milieu complexe (Dasu et Panda., 2000; Bashir *et al.*, 2012; El Sheekh *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

2.4. Modélisation

La modélisation est l'objectif du plan d'expériences. Une fois que les facteurs influents sont identifiés, elle permet de trouver la forme de cette influence et l'équation ou la fonction qui décrivent les variations du phénomène étudié en fonction des facteurs influents (Goupy, 2006).

Toute réponse expérimentale peut être écrite sous la forme suivante :

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon$$

Où y est la grandeur d'intérêt et la réponse expérimentale, X_k , les facteurs influents contrôlés et ε , l'erreur expérimentale. Quant à f , elle est une fonction inconnue (modèle théorique) des facteurs influents contrôlés (X_1, X_2, \dots, X_k).

L'équation de régression obtenue sur la base de l'expérience s'écrit sous la forme suivante :

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{\substack{U,j=1 \\ U \neq j}}^k b_{uj} X_u X_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} X_j^2 \quad (1)$$

Où \hat{y} est la réponse estimée (valeur prédite par le modèle) de y (valeur expérimentale), X_j représentent les coordonnées des facteurs X_k exprimées en variables centrées réduites, ($j=1, \dots, k$).

On appelle les coefficients :

b_0 : Terme constant de l'équation de régression, b_j : Effets linéaires, b_{uj} : Effets d'interactions, b_{jj} : effets quadratiques. Chaque valeur expérimentale y_i est sujette aux erreurs aléatoires ε_i à distribution normale telle que (Benoist *et al.*, 1994; Goupy, 2006):

$$y_i = \hat{y}_i + \varepsilon_i$$

2.5. Modélisation par la méthodologie des surfaces de réponse

La méthodologie des surfaces de réponse (RSM, pour '*Response Surface Methodology*') constitue le second volet de la méthode des plans d'expérience. Cette technique vise à déterminer d'une façon quantitative les variations de la fonction réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative (Box et Draper 1987; Goupy, 1999). Elle vient ainsi s'appliquer à la suite du screening, puisque logiquement, elle n'utilise que les facteurs précédemment jugés pertinents.

Les méthodologies de RSM, ou plans de second degré sont un ensemble de techniques statistiques basées sur l'ajustement d'une équation polynômiale aux données expérimentales, qui doivent décrire le comportement d'un ensemble de données dans le but de faire des prévisions statistiques. L'objectif final est d'optimiser les niveaux des variables significatives pour atteindre le meilleur système de performance (Bezerra *et al.*, 2008). En d'autres termes, dans cette méthode, il est question d'optimisation mais aussi d'évaluation des relations pouvant exister entre les différentes réponses, ainsi que les facteurs ou variables appelés (X_1 X_2 X_3 ... etc). Selon Lee (2019), il s'agit d'une approche puissante et généralisée pour comprendre les relations de cause à effet entre les variables ainsi que le processus d'optimisation. Pour ce faire, plusieurs plans factoriels sont employés par cette technique pour l'analyse des résultats à savoir le plan Box-Behnken et le plan central composite pour « centre composite design » (Qiu *et al.*, 2013).

Comme expliqué plus haut, la notion de « surface de réponse », répond à l'équation (1) nommée fonction de réponse où les niveaux de X_j X_j représentent les coordonnées d'un point expérimental et y la valeur de la réponse en ce point. La Figure 12 (p 35) donne un exemple de représentation graphique de la fonction réponse en fonction de 2 facteurs. La surface de réponse correspond à l'ensemble des réponses de tous les points du domaine expérimental représenté par la zone verte de cette Figure. Le nombre et l'emplacement des points expérimentaux sont le problème fondamental des plans d'expériences. La méthode repose sur le fait de chercher à obtenir la meilleure précision possible sur la surface de réponse tout en limitant le nombre d'expériences (Goupy, 2006).

Par ailleurs, l'application de la RSM comme technique d'optimisation suit des étapes à savoir : (1) la sélection de variables indépendantes à effets majeurs ou significatifs sur le système par des études de dépistage et de délimitation du domaine expérimental, selon l'objectif de l'étude et de l'expérience du chercheur ; (2) le choix de la conception expérimentale et de la réalisation des expériences selon la matrice expérimentale choisie ; (3) le traitement mathématique et statistique des données grâce à l'équation générée par le logiciel ; (4) l'évaluation de l'aptitude du modèle ; (5)

la vérification de la nécessité et possibilité d'effectuer un déplacement en direction de l'optimum ; et enfin (6) obtenir les valeurs optimales pour chaque élément étudié variable.

Le résultat typique d'une expérience de screening de milieux de culture par exemple est que les composants du milieu les plus importants sont identifiés. Ces composants doivent ensuite être étudiés dans un nouveau plan expérimental dans le but de déterminer les valeurs optimales de ces facteurs. Cela nécessite l'utilisation d'autres plans expérimentaux plus élaborés, tel que le plan de centrale composite (CCD) (Wang *et al.*, 2011), la matrice de Doehlert (DM) ou encore le plan de Box-Behnken (BBD) (Joshi *et al.*, 2006; Kanmani *et al.*, 2013). Ces plans sont capables d'ajuster une équation de prédiction de second ordre pour la réponse du type de (1) (Sharma et Singh, 2012).

La Figure 13 illustre le cas d'une optimisation RSM à trois facteurs avec application du plan de Box-Behnken (BB). Dans ce cas, les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure 13). Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point(s) central(aux).

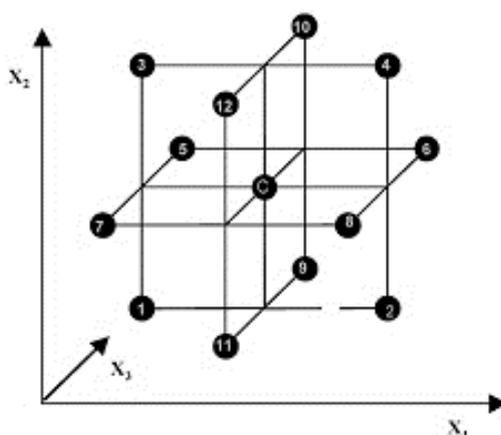


Figure 13. Plan Box-Behnken pour trois facteurs étudiés (Goupy, 2006).

Le Tableau 5 représente la matrice indiquant ces douze essais accompagnés d'un seul point central. Dans la pratique, on réalise souvent 3 ou 4 points au centre (Goupy, 2006). Les résultats des expériences (essais) de BB sont représentés dans un *tracé de contour* ou une *surface de réponse* où l'optimum des facteurs étudiés est clairement visualisé (Figure 14). Cette étape finale du plan porte le nom de la *méthodologie de surface de réponse* (RSM).

Plusieurs chercheurs travaillant sur des programmes de découverte d'antibiotiques ont utilisé la RSM comme outil statistique pour reconnaître, manipuler et optimiser les constituants influents du milieu de culture, et ont enregistré l'augmentation de la production d'antibiotiques (Sircar *et al.*, 1998; Dasu et Panda., 2000; Elibol, 2004; Wang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2017).

Tableau 5. Plan de Box- Behnken pour 3 facteurs.

N°	Facteur	Facteur	Facteur
1	0	- 1	- 1
2	+ 1	0	- 1
3	0	+ 1	- 1
4	- 1	0	- 1
5	- 1	- 1	0
6	+ 1	- 1	0
7	+ 1	+ 1	0
8	- 1	+ 1	0
9	0	- 1	+ 1
10	+ 1	0	+ 1
11	0	+ 1	+ 1
12	- 1	0	+ 1
13	0	0	0

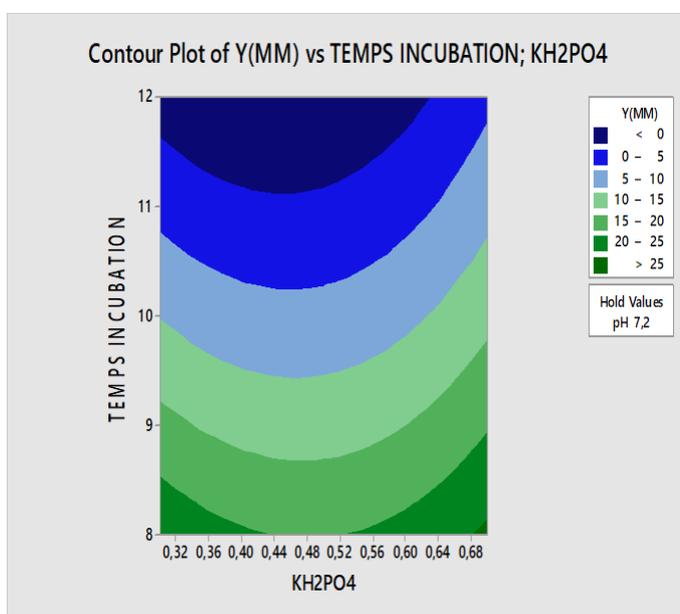


Figure 14. Représentation d’une optimisation d’activité antimicrobienne avec un plan expérimental BB et tracé de contour définissant l’interaction entre le temps d’incubation et la concentration en dihydrogène phosphate de potassium sur l’axe des x et des y respectivement et montrant une réponse représentée sous forme d’hélice.

Chapitre II

MATERIELS ET METHODES

I. LA SOUCHE SACCHAROTHRIX TAMANRASSETENSIS SA198

1. Origine de la souche

La souche *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 provient du Laboratoire de Microbiologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'École Normale Supérieure de Kouba (Alger). Elle a été isolée en 1995 par Zitouni lors d'un criblage de souches d'actinobactéries productrices d'activités antimicrobiennes provenant des sols du Hoggar, dans la région de Tamanrasset (Algérie), en utilisant le milieu « chitine-vitamines B-agar » (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionné d'actidione (50 µg/mL).

2. Conservation de la souche

La souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 a été initialement récupérée à partir d'une culture en tube à vis incliné dans le milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2, Shirling et Gottlieb, 1966), dont la composition pour 1L de milieu est la suivante : Glucose, 4 g ; extrait de malt, 10 g ; extrait de levure, 4 g ; agar, 15 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL ; pH ≈ 7,2. La souche a été ensuite conservée en cryotubes à -20°C sous forme de suspension de spores, et aussi en tubes à vis inclinés (milieu ISP2).

Pour sa conservation en cryotubes, la souche est ensemencée en stries serrées sur milieu ISP2 solide (20 mL) en boîtes de Pétri (diamètre 90 mm). Les boîtes sont incubées pendant 10 jours à 30°C jusqu'à obtenir une bonne sporulation. Après obtention d'un tapis de spores dense, 6 mL d'une solution stérile de Tween 80 à 0,1% sont déposés dans chaque boîte de Pétri. La surface de la culture sporulée est soigneusement grattée avec une anse de platine. La suspension de spores récupérée à l'aide d'une pipette stérile, est mélangée à du glycérol à une concentration finale de 25% (75 mL de solution « Tween + spores » et 25 mL de glycérol 100%), puis répartie dans des tubes cryogéniques de 4,8 mL Nalgene (Fischer), lesquels sont conservés à -20°C.

II. ÉTUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES DE LA SOUCHE SX. TAMANRASSETENSIS SA198

L'évaluation du pouvoir antagoniste de la souche SA198 a été opérée suivant deux méthodes : un criblage classique et un criblage moléculaire. En criblage classique, l'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode des stries croisées et par celle des cylindres d'agar. Le criblage secondaire de notre souche a été effectué via une méthode moléculaire consistant à rechercher la présence de gènes spécifiques de la voie de biosynthèse des molécules antimicrobiennes.

1. Méthode classique de recherche du pouvoir antagoniste

Le dépistage antimicrobien *in vitro* été effectué selon la méthode de diffusion dans la gélose dite des stries croisées, qui est la plus couramment et largement utilisée avec la mesure de la zone d'inhibition (Madigan *et al.*, 1997).

Les microorganismes-cibles, au nombre de quarante (40), sont répartis comme suit : sept (07) bactéries à Gram-positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus* sp., *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* 639c ; cinq (05) bactéries à Gram-négatif (*Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Agrobacterium* sp.), vingt (20) champignons filamenteux (*Fusarium solani*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici*, *Penicillium expansum*, *P. glabrum*, *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829, *Aspergillus carbonarius* M333, *A. niger* OT304, *A. westerdijkiae*, *A. parasiticus* CBS 100926, *A. flavus* NRRL 3251, *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp. et *Botrytis cinerea*), sept (07) levures incluant *Candida albicans* IPA200, *C. albicans* IPA988, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. zeylanoides* et *C. guilliermondii*) et un mycoplasme (*Ureaplasma parvum* ATCC 27813). Les souches sans mention de numéro d'accession appartiennent à la collection du LBSM. *Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91 et *Escherichia coli* ATCC 8739 sont multirésistantes aux antibiotiques.

1.1. Méthode des stries croisées

L'activité antimicrobienne de la souche SA198 a été évaluée par la technique des stries croisées sur le milieu ISP2 solide (Waksman, 1947; Williston *et al.*, 1947). La souche est ensemencée en un seul trait à la surface du milieu et en bordure de la boîte de Pétri (D = 9 cm). Après une incubation de 8 à 10 jours à 30°C, les microorganismes cibles sont inoculés par stries perpendiculaires à l'actinobactérie. La lecture des résultats est effectuée après 24 à 48 h d'incubation et consiste en la mesure de la zone d'inhibition entre le bord de l'actinobactérie et le germe cible.

1.2. Méthode moléculaire : Recherche des gènes de biosynthèse des antibiotiques

Cette méthode permet de déterminer le pouvoir antagoniste de la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 en recherchant la présence de certains gènes de biosynthèse des antibiotiques. Il s'agit des gènes codant pour les enzymes polykétides synthétases (PKS-I et PKS-

II) et peptide synthétase non ribosomales (NRPS). Ces séquences de gènes sont amplifiées par PCR en utilisant des amorces spécifiques.

➤ **Extraction de l'ADN génomique**

A la surface d'une boîte de culture de 8 jours à 28°C de la souche *Sx. tamanrassetensis*, du mycélium est prélevé aseptiquement à l'aide d'un cure-dents stérile et transféré dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL. L'ADN est extrait selon la méthode de [Liu et al. \(2000\)](#) par addition de 500 µL d'une solution de lyse composée de 400 mM de Tris-HCl [pH 8], 60 mM d'EDTA [pH 8], 150 mM de NaCl et 1% de sulfate de sodium dodecyl (SDS). A l'aide d'un, cône stérile, le mycélium est bien écrasé dans le tampon de lyse puis laissé à température ambiante pendant 15 min afin que le processus de lyse s'opère. Une solution composée d'acétate de potassium à 5 M et de 11,5% d'acide acétique glacial à pH 4,8 est ajoutée à raison de 150 µL au mélange précédent. Le tout est vortexé brièvement puis centrifugé une minute à 12 000 g. A partir du surnageant, 400 µL de solution réactionnelle sont récupérés et transférés dans un autre tube Eppendorf stérile. Un volume équivalent d'isopropanol est additionné à la solution réactionnelle puis mélangés brièvement par inversion, avant d'être centrifugés de nouveau pendant 2 min à 12 000 g. Enfin, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 300 µL d'éthanol à 70% par centrifugation pendant 1 mn à 12 000 g. L'ADN extrait (le culot) est mis à sécher une nuit à température ambiante puis re-suspendu dans 40 µL d'eau bidistillée stérile et conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

La qualité et la quantité d'ADN extrait sont évaluées par spectrophotométrie à l'aide d'un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La densité optique (DO) est mesurée simultanément pour l'échantillon à deux longueurs d'ondes différentes : 260 nm (longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques) et 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines).

➤ **Amplification par PCR de la séquence adénylation du Peptide Non-Ribosomal (NRPS) et de la séquence kétosynthétase des Polykétides Synthétases (PKS)**

La PCR consiste à amplifier de manière spécifique et en grande quantité un fragment d'ADN par action répétée d'une ADN polymérase. Les séquences des domaines adénylation des NRPS et kétosynthétase des PKSs ont été amplifiées en ayant recours à une série de paires d'amorces spécifiques : A3F/A7R (NRPS), K1F/M6R (PKS I) et KS α /KS β (PKS II) et ce afin de repérer les gènes codant pour ces domaines ([Tableau 6](#)) dans la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198.

L'expérience consiste à réunir dans un mélange final de 50 µL les composés suivants :

- L'ADN matrice à raison de 20 à 40 ng,

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

- Un mélange de 0,4 µM de désoxynucléoside triphosphate (dNTP),-Les amorces à raison de 2 µM chacune,
- Le tampon 1X composé de MgCl₂ de 2,5 U de Taq ADN polymérase et de 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO).

Tableau 6. Liste des amorces utilisées pour l'amplification des domaines cibles des PKS et NRPS.

Gènes (domaine)	Amorces	Séquences (5'–3')	Références
NRPS (Adénylation)			Walsh, 2007
F	A3F	5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG3-3'	
R	A7R	5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS3-3'	
PKS-I (Kétosynthétase)			
F	K1	5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'	
R	M6R	5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'	
PKS II (Kétosynthétase)			Metsä-Ketelä <i>et al.</i> , 1999
F	KS α	5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3'	
R	KS β	5'-TGGAANCCGCCGAABCCTCT-3'	

S = C (cytosine) ou G (guanine) ; Y = C ou T (thymine) ; B = C, G ou T ; N = A (adénine), T, C ou G et V = A, C, ou G.

La PCR a été réalisée dans un système TProfessional Trio PCR (Biometra, Goettingen, Allemagne). L'eau distillée a été utilisée comme contrôle. Les conditions de la PCR comprennent une première dénaturation à 98°C pendant 4 min suivie de 30 cycles avec dénaturation à 94°C durant 1 min et hybridation pendant 1 min à 57,5°C avec K1F/M6R, à 58°C avec KS α /KS β et à 57°C avec A3F/A7R suivie d'une extension durant 2 min à 72°C. L'extension finale est opérée à 72°C pendant 10 min.

Le produit de PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% (p/v). Les bandes qui s'étendent de 1200 à 1400 pb, 600 pb et 700 à 800 pb correspondent respectivement aux produits des gènes PKS-I, PKS-II et NRPS.

III. CINETIQUE DE PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE SA198 EN MILIEU LIQUIDE

Dans cette partie du travail, la production de l'activité antimicrobienne est étudiée en testant différentes sources d'azote et de carbone par la méthode classique « un facteur à la fois ». Le but est de sélectionner les meilleures sources nutritionnelles permettant une production optimale de l'activité antimicrobienne. Les deux sources de carbone et d'azote retenues seront utilisées dans les expériences d'optimisation de la production.

1. Le milieu de culture pour les pré-cultures et les cultures de production

Le choix du milieu de culture pour les pré-cultures et les cultures de production des antibiotiques par la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 s'est porté sur le milieu de base mis au point par [Strub \(2008\)](#) mais que nous avons légèrement modifié en supprimant deux constituants qui sont le MOPS (acide 3-(N-Morpholino) propansulfonique) et le $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. La composition du milieu de base est comme suit : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g ; KH_2PO_4 0,5 g ; K_2HPO_4 1 g ; NaCl 2 g ; CaCl_2 1 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml, $\text{pH} \approx 7,2$.

1.1. Les pré-cultures

La souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 est réactivée en prélevant le contenu (200 μL) des cryotubes (conservés à -20°C) par la méthode d'inondation sur le milieu ISP2 gélosé (en boîte de Pétri) jusqu'à obtention d'une bonne croissance et sporulation (10 jours à 28°C). Ces cultures en boîtes de Pétri constituent l'inoculum qui servira à ensemercer les pré-cultures.

Les pré-cultures sont préparées dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture. A partir des boîtes sporulées d'ISP2, un inoculum composé de deux (02) carottes de 4 mm de diamètre sont découpées à l'emporte-pièce stérile et ajoutés aseptiquement dans chaque fiole tel que décrit par [Ahsan et al. \(2017\)](#). Cet inoculum correspond à une charge de 10^5 - 10^6 spores par mL ([Wang et al., 2011](#)). Les fioles ainsiensemencées sont ensuite incubées en agitation rotative (250 rpm) durant 3 jours à 30°C .

Pour chaque source d'azote ou de carbone testée, 3 répétitions (3 fioles d'Erlenmeyer) sont effectuées. Après 3 jours d'incubation à 30°C sur un agitateur rotatif (250 rpm), les pré-cultures obtenues vont servir à leur tour à ensemercer des Erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL du même milieu liquide avec un inoculum de 5 mL de la pré-culture (soit 5 % du volume utile).

Les cultures sont incubées à 30°C sous agitation à 250 rpm. La durée d'incubation est de 10 jours. Chaque expérience est répétée trois fois. L'évolution de l'activité antibiotique, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement ([Figure 15](#)).

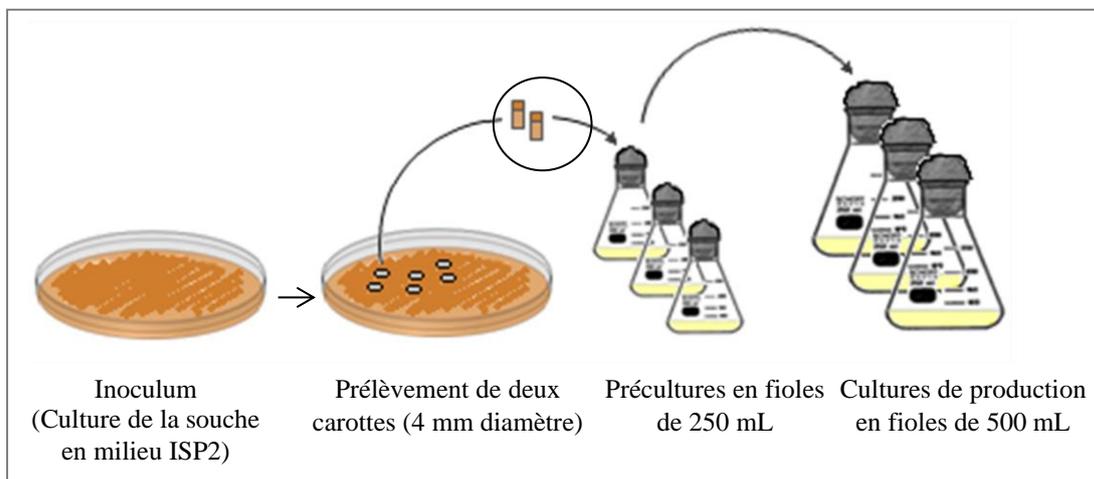


Figure 15. Mise en culture de la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 pour la production des antibiotiques en fioles d'Erlenmeyer.

1.2. Les cultures pour les cinétiques de production

Les cinétiques de production des antibiotiques ont été réalisées sur le milieu de culture de base, additionné de différentes sources d'azote et de carbone.

Le choix des sources d'azote et de carbone est basé sur les résultats obtenus par [Boubetra \(2013\)](#) et [Laassami \(2015\)](#). Un protocole commun pour les cinétiques est schématisé dans la [Figure 16](#). Les milieux de production sont inoculés avec les pré-cultures.

Chaque expérience est réalisée en triple. Les cinétiques sont suivies pendant 10 jours à 30°C, et des prélèvements sont effectués toutes les 24 heures pour suivre l'évolution de la production de l'activité antimicrobienne, la croissance et le pH. Les cinétiques réalisées sont conduites dans les mêmes conditions à savoir, la taille de l'inoculum, les volumes de pré-cultures et de cultures, les conditions de prélèvements et de mesures.

1.3. Les sources d'azote

Seize composés ont été testés en tant que sources d'azote : Le corn steep liquor à 5 % (poids/volume) (p/v), l'extrait de levure, l'extrait de malt, la peptone de caséine, la caséine, le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) et la tryptone à 0,25 % (p/v), la L-proline, la L-tyrosine, la L-alanine, l'arginine, la valine, la leucine, la méthionine, la cystine et la lysine à 0.05 % (p/v). Lors de cette cinétique, le milieu de culture est additionné de glucose en tant que source de carbone à 1% (p/v). La source d'azote permettant une production optimale sera retenue pour réaliser les cinétiques des sources de carbone.

1.4. Les sources de carbone

Dans la seconde série de cinétiques, huit sources de carbone sont testées : le glucose, les dextrines, le fructose et le saccharose, ajoutées chacune à raison de 1% (p/v), mais aussi le propionate, le pyruvate, le succinate et l'acétate de sodium à 0.1% (p/v). Dans le cas de cette cinétique, le corn steep liquide à 5% (p/v) a été utilisé comme source d'azote dans le milieu de base.

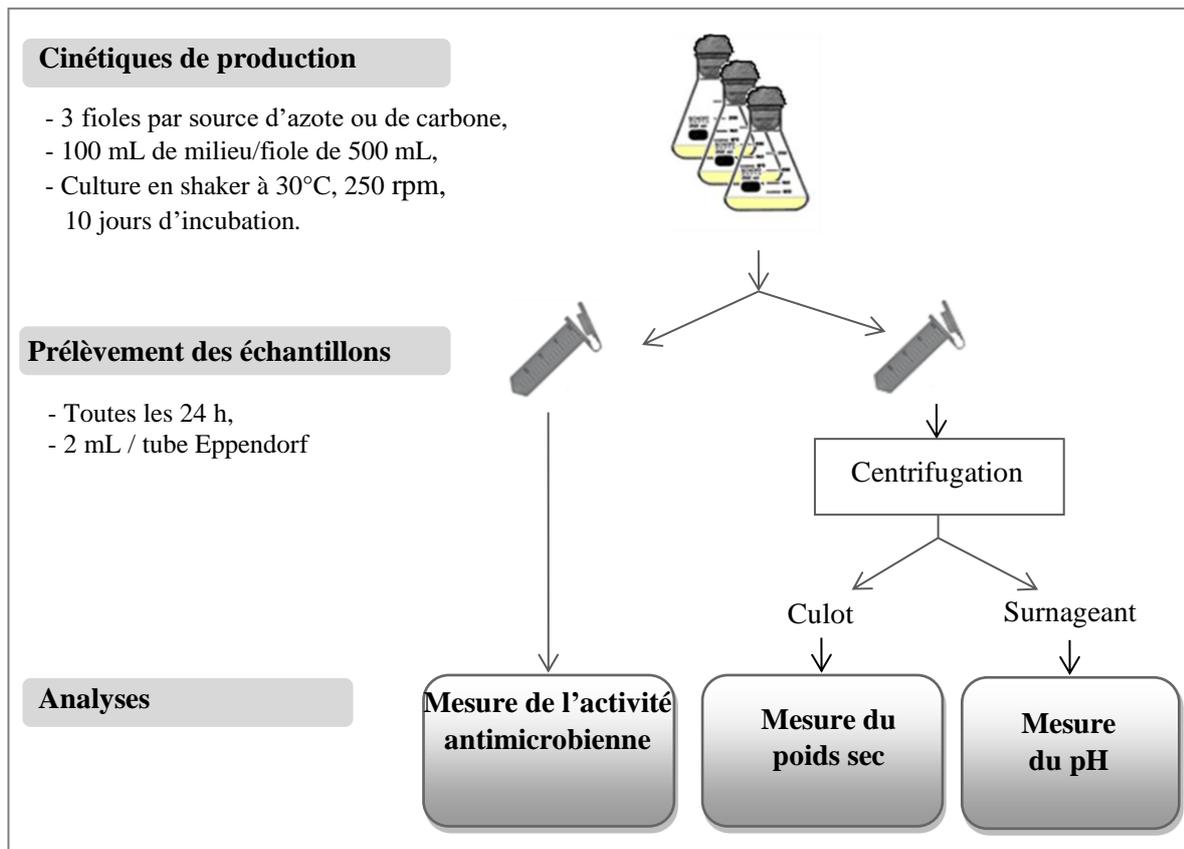


Figure 16. Protocole de suivi des cinétiques de culture de production des antibiotiques.

2. Mesures de l'activité antimicrobienne, de la croissance et du pH

Pour la mesure de l'activité antimicrobienne produite, de la croissance et du pH, 4 mL de culture homogénéisée sont prélevés toutes les 24 h à partir de chaque fiole d'Erlenmeyer, et sont répartis en deux tubes Eppendorf stériles. Un des 2 tubes Eppendorf est centrifugé à 12 000 rpm pendant 10 mn. Le surnageant servira à la mesure du pH au moyen d'un pH mètre de marque Hanna instruments et le culot servira à la mesure de la croissance. L'autre tube Eppendorf non centrifugé servira à la détermination de l'activité antimicrobienne.

2.1. Mesure de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est évaluée selon les standards de EUCAST (EUCAST, 2018) et par la méthode conventionnelle de diffusion des puits contre les germes-cibles ayant montré la plus grande sensibilité dans les tests déterminant le pouvoir antagoniste de la souche SA198, à savoir : les deux bactéries *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (BS) et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline SARM ATCC 639c (SA) et le champignon *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (UR). Les suspensions des germes cibles sont calibrées à l'étalon 0,5 de la gamme de Mc Farland.

Les milieux de culture utilisés sont le milieu Mueller-Hinton (IPA⁴) pour les bactéries et le milieu Sabouraud (IPA) pour les champignons et ne contiennent que 12 g d'agar par litre de milieu. Les milieux préparés sont préalablement ensemencés avec une souche-cible à raison de 100 uL pour 100 mL de milieu de culture, avant d'être coulés en boîtes de Pétri.

Après solidification du milieu à la température du laboratoire, des puits sont creusés aseptiquement à l'aide d'un emporte-pièce de 7 mm de diamètre.

A partir d'un échantillon de 2 mL de surnageant de culture prélevé dans un des 2 tubes Eppendorf stériles (Figure 16), un aliquote de 0,1 mL est introduit dans chaque puits. Les boîtes sont entreposées 2 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives et l'arrêt provisoire de la croissance des germes-cibles, puis incubées pendant 24 h (pour les bactéries) et 48 h (pour les champignons) à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant avec une règle graduée, le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits.

2.2. Mesure de la croissance

Le tube Eppendorf préalablement taré et contenant le culot, sert pour la mesure de la croissance par la mesure du poids sec de la biomasse (Pfefferle *et al.*, 2000). Pour cela, le tube renfermant le culot est déposé dans un four à 105°C pendant 24 h puis pesé (balance analytique, KERN). Le poids sec obtenu est rapporté en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture.

IV. OPTIMISATION STATISTIQUE DE LA PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Après sélection des meilleures sources d'azote et de carbone permettant une bonne production de l'activité antimicrobienne par la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198, des essais d'optimisation statistique ont été entrepris dans le but d'améliorer cette production.

⁴ Institut Pasteur d'Alger

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

La méthode d'optimisation choisie est basée sur l'utilisation des plans d'expériences. Il s'agit de rechercher le lien existant entre une grandeur d'intérêt y et des variables x_i , (Goupy, 2006), dans notre cas l'activité antimicrobienne, et les paramètres régissant cette activité respectivement. C'est un test à deux niveaux qui peut être symbolisé par une fonction du type : $Y = f(X_i)$.

Pour cela, l'optimisation du milieu de culture est réalisée en deux étapes. La première étape a pour but de sélectionner les facteurs (variables ou paramètres) ayant un effet positif sur la production avec l'emploi du plan de Plackett et Burman (1946). C'est un test à deux niveaux, ce qui est notre cas, basé sur un modèle mathématique du premier degré. La deuxième étape de l'optimisation permet de déterminer les optima des paramètres sélectionnés en utilisant un autre outil statistique qui est la méthodologie de surface des réponses via le plan de Box et Behnken (1960).

La Figure 17 résume le cheminement entrepris pour l'optimisation de la production de l'activité antimicrobienne par la souche SA198. Le milieu de culture de production sur lequel portera l'optimisation a la composition suivante pour 1L de milieu : Saccharose 10 g ; Corn steep liquor 50 g ; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,2 g ; KH_2PO_4 0,5 g ; K_2HPO_4 1 g ; NaCl 2 g ; $CaCl_2$ 1 g ; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,01 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; $pH \approx 7,2$.

1. Détermination des facteurs influençant la production de l'activité antimicrobienne par Plackett-Burman design

Un plan d'optimisation séquentiel est appliqué afin d'améliorer la production de l'activité antimicrobienne. Le plan Plackett-Burman (étape 1-Figure 17) est employé dans une première étape afin de déterminer les composants du milieu et autres paramètres ayant une influence directe sur la production de biomolécules. Le but de cette expérimentation est de recenser les paramètres significatifs régissant cette synthèse. Pour ce faire, sept facteurs ont été testés comprenant les sources d'azote et de carbone sélectionnées auparavant plus cinq autres variables à savoir ; KH_2PO_4 ; K_2HPO_4 ; $CaCl_2$; NaCl et le temps d'incubation. Le Tableau 7 reprend les valeurs choisies pour les différents facteurs opératoires étudiés à différents niveaux (concentrations et jours).

Tableau 7. Valeurs extrêmes des paramètres opératoires étudiés.

Variabiles	Composant du milieu	Niveau bas (-1) (g/L)	Niveau haut (+1) (g/L)
X₁	Saccharose	5	15
X₂	K ₂ HPO ₄	0,5	1,5
X₃	CaCl ₂	0,5	1,5
X₄	NaCl	0,5	3,5
X₅	Corn steep liquor	30	70
X₆	Temps d'incubation	8 jours	12 jours
X₇	KH ₂ PO ₄	0,3	0,7

Douze milieux de cultures ont été préparés avec des composants à des concentrations variables selon la matrice des expériences donnée par le logiciel " MINITAB 17.0" et représentée dans le [Tableau 8](#) où 12 lignes ont été générées. La souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 estensemencée sur chaque milieu et incubée à 30°C dans un Shaker (model G25, New Brunswick Scientific Co. N.J., USA) à 250 rpm pendant 8, 10 ou 12 jours. A l'issue de chaque fermentation, les filtrats de culture sont testés contre les trois germes cibles SARM ATCC 639c (SA), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (BS) et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (UR). La réponse pour chaque expérience représente la moyenne de l'inhibition obtenue de trois répétitions pour chaque expérience.

Aussi, le plan PB est construit sur le modèle d'équation de premier ordre comme suit :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7$$

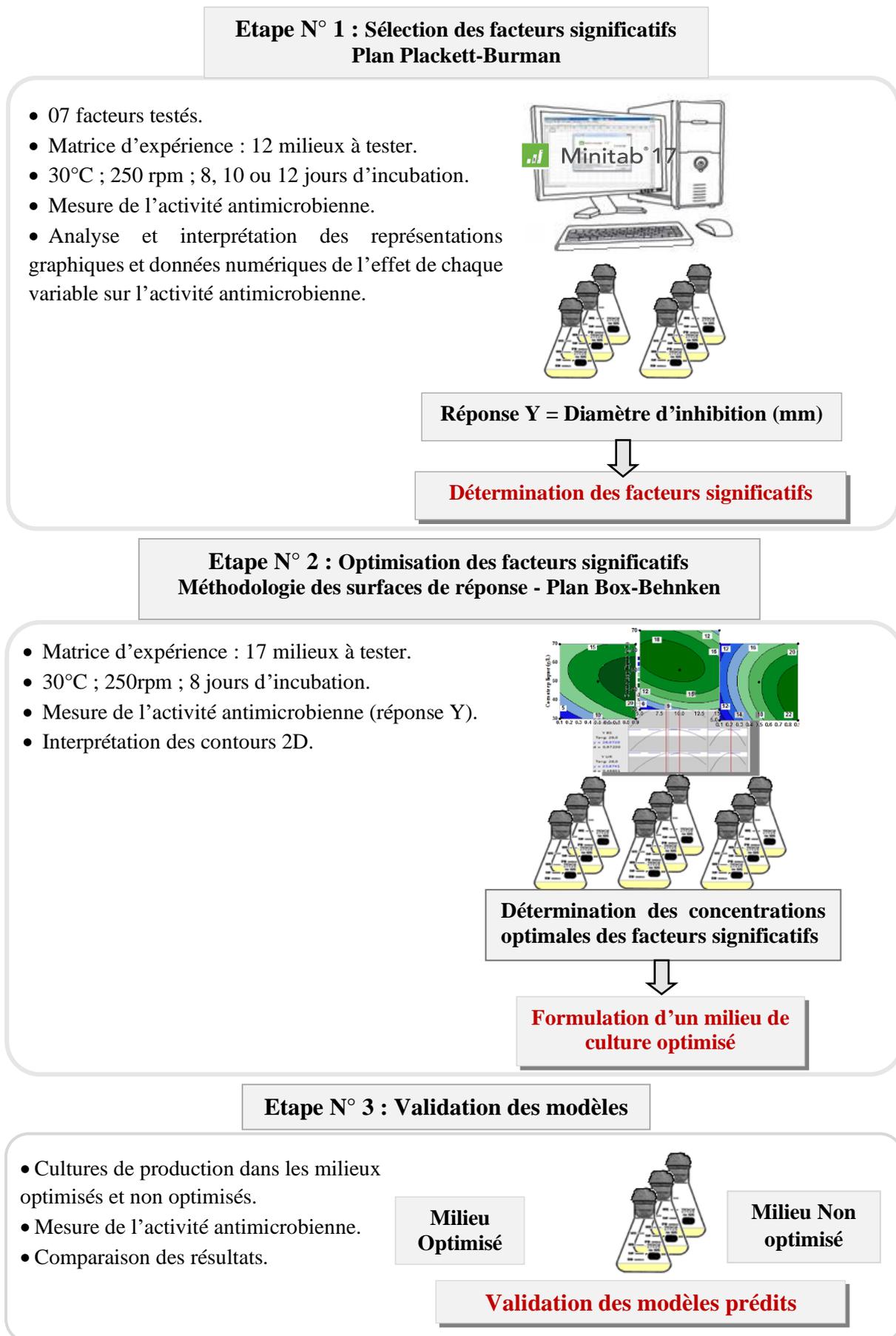


Figure 17. Schéma du protocole d'optimisation statistique de la production de l'activité antimicrobienne par la souche SA198.

Tableau 8. Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 7 variables.

Milieu de culture	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	Codes						
								X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
M. 01	5	1,5	1,5	3,5	30	12	0,7	-	+	+	+	-	+	+
M. 02	5	1,5	1,5	0,5	70	8	0,3	-	+	+	-	+	-	-
M. 03	5	1,5	0,5	0,5	30	12	0,7	-	+	-	-	-	+	+
M. 04	5	0,5	1,5	3,5	70	8	0,7	-	-	+	+	+	-	+
M. 05	5	0,5	0,5	3,5	70	12	0,3	-	-	-	+	+	+	-
M. 06	15	0,5	0,5	0,5	70	12	0,7	+	-	-	-	+	+	+
M. 07	15	0,5	1,5	0,5	30	8	0,7	+	-	+	-	-	-	+
M. 08	15	0,5	1,5	3,5	30	12	0,3	+	-	+	+	-	+	-
M. 09	15	1,5	1,5	0,5	70	12	0,3	+	+	+	-	+	+	-
M. 10	15	1,5	0,5	3,5	30	8	0,3	+	+	-	+	-	-	-
M. 11	15	1,5	0,5	3,5	70	8	0,7	+	+	-	+	+	-	+
M. 12	5	0,5	0,5	0,5	30	8	0,3	-	-	-	-	-	-	-

C1 : Saccharose ; C2 : K_2HPO_4 ; C3 : $CaCl_2$; C4 : NaCl ; C5 : Corn steep liquor ; C6 : Temps d'incubation et C7 : KH_2PO_4 . M : milieu de culture ; X : code.

2. Optimisation des variables significatives par la « méthodologie des surfaces de réponse » et le plan « Box Behnken »

Le plan [Box-Behnken \(1960\)](#) (étape 2-[Figure 17](#)) est adopté pour déterminer les optima des variables significatives ayant permis une meilleure production de l'activité antimicrobienne par la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 dirigée contre les germes cibles sélectionnés SA, BS et UR.

Ces plans pour surfaces de réponse sont des plans du second degré permettant d'établir des modèles mathématiques du second degré. Par ailleurs ayant trois facteurs à étudier dans notre cas, l'emploi du plan [Box-Behnken](#) est le plus adapté à l'étude de trois facteurs.

Les variables significatives influençant la production d'antibiotiques vis-à-vis des germes cibles sont les concentrations en corn steep liquor, saccharose et KH_2PO_4 . Le [Tableau 9](#) fournit le plan d'expérience à suivre selon le modèle « Box Behnken » et regroupe les variations de concentrations testées des trois variables significatives. Ce plan factoriel admet que la réponse est linéaire quand un facteur passe d'un niveau minimal à un niveau maximal symbolisés par les signes (-) et (+) définissant la valeur basse et haute de chaque facteur respectivement. Ainsi les facteurs déterminants ont été analysés à trois niveaux : la concentration la plus basse, la moyenne et la plus haute, ce qui donne respectivement (-1), (0) et (+1), l'unité de la source saccharose est fixée à (5) ; celle du corn steep liquor à (20) et celle de KH_2PO_4 à (0,4). Les autres paramètres sont gardés à leurs concentrations initiales telles que dans le milieu originel. Un total de dix-sept modèles expérimentaux a été fourni par le plan factoriel Box-Behnken grâce au logiciel « MINITAB. 17 ». Dix-sept expériences en présence de la souche SA198 ont été conduites en cultures agitées (8 jours à 30°C, 250 rpm), dont cinq parmi elles étaient des répliques du point central. L'activité du filtrat de culture a été mesurée par la méthode de diffusion des puits, au huitième jour de fermentation. Les valeurs des activités (réponses) représentent la moyenne de deux répétitions par expérience.

Enfin, sur la base de l'analyse des surfaces de réponse et précisément des ellipses générées par la représentation 2D en contour plot, les optima des facteurs analysés ont été déduits, en utilisant la fonction d'optimisation du Logiciel MINITAB. 17. Dans le logiciel, l'outil « Optimisation de la réponse » a fini par déterminer les valeurs optimales pour un maximum d'activité antimicrobienne.

Tableau 9. Matrice d'expériences donnée par le modèle « Box Behnken » pour les variables significatives (codes) pour l'optimisation de la production des antibiotiques.

Test N°	A CSL ^a	B Sucrose	C KH ₂ PO ₄	Niveau	A (g/L) CSL	B (g/L) Sucrose	C (g/L) KH ₂ PO ₄
1	0	0	0				
2	0	0	0				
3	0	0	0				
4	-1	-1	0				
5	1	0	1				
6	1	-1	0				
7	0	1	1	-1	30	5	0,1
8	1	0	-1				
9	0	-1	-1	0	50	10	0,5
10	0	0	0				
11	-1	0	1	+1	70	15	0,9
12	-1	1	0				
13	-1	0	-1				
14	1	1	0				
15	0	-1	1				
16	0	0	0				
17	0	1	-1				

^a Corn steep liquor ; (+1) : niveau supérieur du facteur ; (-1) : niveau inférieur du facteur ; (0) : niveau moyen du facteur.

3. Validation des modèles expérimentaux

Les valeurs des optima ayant été déterminées, une confirmation pratique du modèle est nécessaire afin de le valider, ou au contraire le rejeter (étape 3-[Figure 17](#)). Des cultures de production ont été entreprises aux concentrations optimales des trois facteurs sélectionnés (Saccharose ; Corn steep liquor ; KH₂PO₄) dans les mêmes conditions de culture cités dans la section (IV.2), chacune répétée trois fois. A l'issue de l'expérimentation, un test d'antibiogramme a été réalisé contre les trois germes cibles considérés dans notre étude. Les valeurs des zones d'inhibitions obtenues ont été comparées à celles prédites par le logiciel. La validation du modèle a ensuite été entreprise en réalisant des cultures dans les conditions optimales où l'activité antimicrobienne expérimentale mesurée a été comparée à celle prédite par le modèle.

V. PRODUCTION ET PURIFICATION DES ANTIBIOTIQUES

Pour la production et la purification des antibiotiques, des cultures sont d'abord réalisées en fermenteur en mode discontinu (Batch) dans les conditions optimales déterminées précédemment. Au jour de production optimale, les biomolécules sont extraites puis purifiées par HPLC. La Figure 18 montre un protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques.

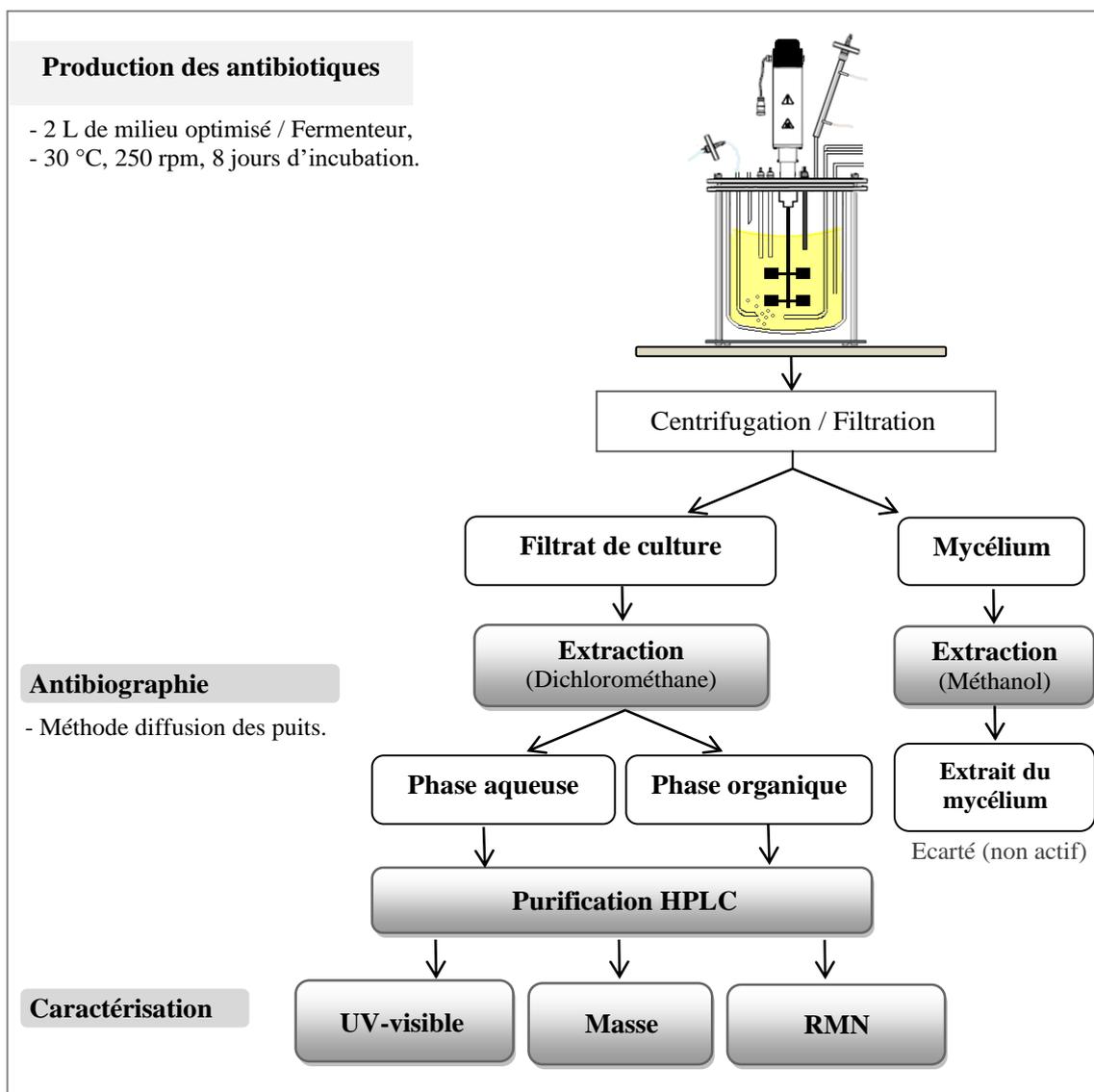


Figure 18. Schéma illustrant les différentes étapes de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques.

1. Conditions de culture pour la production des antibiotiques

La mise en culture de *Sx. tamanrassetensis* pour la production des antibiotiques est effectuée selon le schéma illustré par la Figure 19. Le milieu de culture préparé pour les précultures et pour

Chapitre II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

les cultures correspondent au milieu optimisé dont la composition est la suivante : **saccharose 7 g** ; **corn steep liquor 52 g** ; **KH₂PO₄ 0,9 g** ; MgSO₄ 7 H₂O 0,2 g ; K₂HPO₄ 1 g ; NaCl 2 g ; CaCl₂ 1 g ; FeSO₄ 7 H₂O 0,01 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; pH ≈ 7,2.

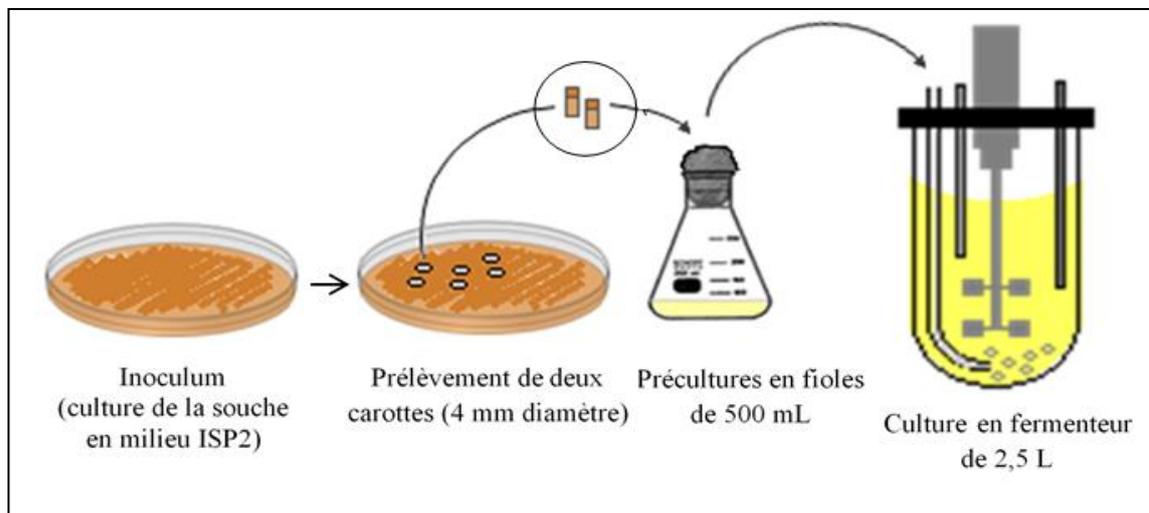


Figure 19. Mise en culture sur fermenteur en mode discontinu de la souche *Sx. tamanrassetensis* pour la production des antibiotiques dans 2 L de milieu optimisé.

Le fermenteur utilisé est le modèle « New Brunswick Scientific » Co., Inc. an Eppendorf Company, Edison, N.J., U.S.A. (Figure 20), disposant des éléments suivants :

- Module de contrôle : Bio Flo 110 Fermentor/Bioreactor, Bio-Command Plus, NBS Bio Command, version plus, BioProcessing Software, géré par ordinateur, il permet d'enregistrer et de piloter tous les paramètres de fonctionnement,
- Dispositif d'aération se composant d'un débitmètre massique à air (Bronkhorst Hi-Tech, série F100/200), d'un filtre à air stérilisable à l'entrée, d'un diffuseur d'air situé dans la partie inférieure de la cuve et d'un condenseur d'eau pour éviter la perte de l'eau par évaporation,
- Cuve ou enceinte en verre de 2,5 L,
- Système d'agitation comportant plusieurs turbines (Magma Technologies Inc., Fermentor/Bioreactor),
- Circuit de refroidissement, eau du réseau circulant dans un serpentin en acier et baignant dans le milieu réactionnel,
- Capteur pour la mesure de la température formé d'une gaine chauffante (New Brunswick, H1, Heat, Ind., MT) entourant la cuve du fermenteur et relié à une sonde baignant directement dans le milieu de fermentation. Il permet l'acquisition en temps réel de la température et son ajustement

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

grâce à l'eau thermostatée circulant dans un serpentín en acier et baignant aussi dans le milieu réactionnel,

- Sonde pH à immersion, stérilisable (Ingold Infit, type 764.50 B/BH).

Les paramètres de la fermentation pour cette culture en batch sont les suivants : pH variable en cours de fermentation. pH initial ajusté à 7,2, température réglée à 30°C. Pour l'aération, le débit d'air initial a été fixé à 1 vvm (volume d'air par volume de liquide par minute) soit 2000 mL d'air par minute. L'agitation à 150 rpm. La durée de la fermentation est de 8 jours soit 192 heures. Le fermenteur est inoculé avec une préculture à 5 % de volume par rapport au volume de la culture soit 100 mL de préculture dans 2 L de culture. Des prélèvements du milieu de culture sont effectués chaque 24 h. L'activité antimicrobienne produite est mesurées par la méthode conventionnelle de diffusion des puits et la biomasse par la mesure du poids sec. Le pH est également noté au moment du prélèvement.

2. Extraction des substances antimicrobiennes

2.1. Extraction à partir du filtrat de culture

Pour l'extraction des substances antimicrobiennes à partir du filtrat de culture, quatre solvants non miscibles à l'eau et de différentes polarités sont testés. Il s'agit du *n*-hexane, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du *n*-butanol. Ce test permet de sélectionner le meilleur solvant d'extraction des substances antimicrobiennes. Au huitième jour de fermentation, le milieu réactionnel (2 L) est récupéré, centrifugé à 12 000 rpm pendant 15 mn puis filtré, de manière à séparer le filtrat de culture du mycélium. Les substances antimicrobiennes sont extraites à partir du filtrat de culture en ampoules à décanter (extraction liquide-liquide). Une fraction de 50 mL du filtrat est placée dans chaque ampoule à décanter (de 250 mL), puis un volume égal (50 mL) en solvant est ajouté. Chaque ampoule est vigoureusement agitée puis laissée reposer. Pour chaque solvant, la phase aqueuse est séparée de la phase organique, puis celle-ci est déshydratée par passage à travers un papier filtre (Whatman n°1) contenant du sulfate de sodium anhydre (5 g) dans le but d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles.

- Les phases organiques ainsi déshydratées, sont concentrées chacune à sec à 40 °C à l'aide d'un rotavapeur (R-210, Buchi, Suisse). Les résidus secs obtenus sont par la suite solubilisés dans du MeOH, transvasés dans des piluliers, puis séchés à l'air comprimé.
- Les phases aqueuses sont récupérées puis concentrées à sec à une température de 50 °C. chaque résidu obtenu est repris dans un minimum d'eau ultra pure (1 mL).

- Les extraits secs des phases aqueuses et organiques, sont testés par antibiographie.

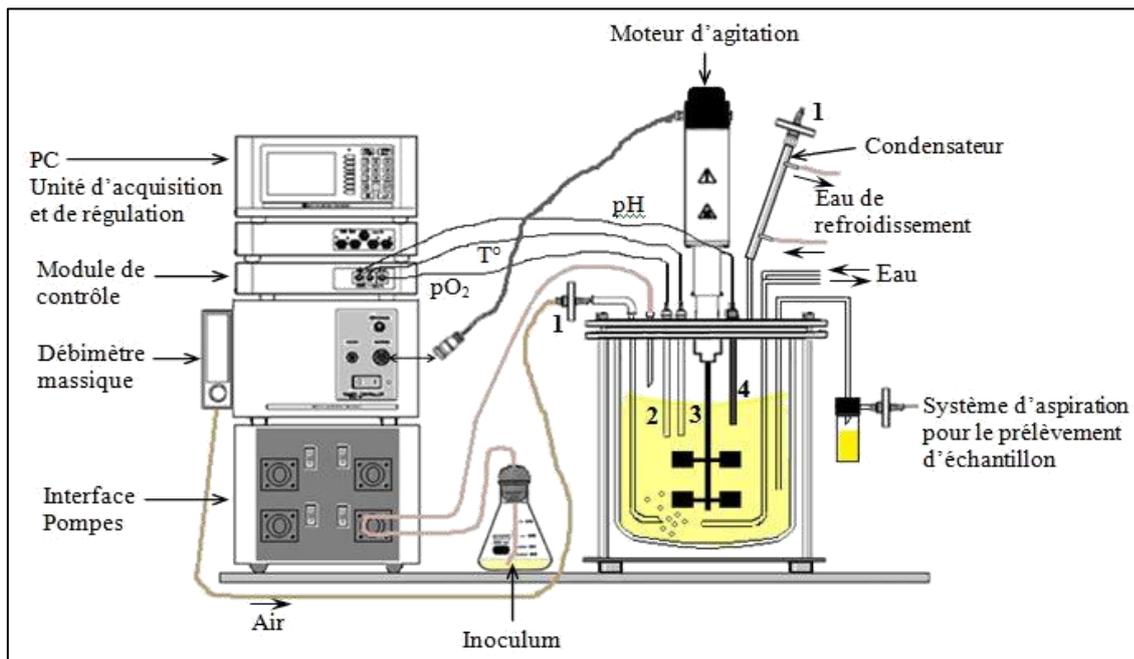


Figure 20. Schéma général de l'installation du bioréacteur.

1. Filtre à air. 2. Sonde oxygène. 3. Sonde température. 4. Sonde pH.

2.2. Extraction à partir de la biomasse mycélienne

A la suite de la centrifugation de la culture issue du fermentateur, le culot obtenu et représentant le mycélium est recueilli, lavé plusieurs fois à l'eau distillée, puis égoutté. L'extraction des molécules bioactives sur ce mycélium se déroule selon la méthode de [Mechlinski \(1978\)](#). La biomasse est pesée pour 500 mL de culture et mise en contact avec un volume précis de méthanol (1 gramme de mycélium pour 50 mL de méthanol), sous agitation durant 2 h à température ambiante. Après filtration, l'extrait méthanolique est concentré à sec, puis récupéré dans 1 mL de méthanol afin de le tester par antibiographie.

Tests d'antibiographie

Un test d'antibiographie est effectué pour les deux extraits secs de la phase aqueuse (EA) et organique (EO) contre les organismes tests (SARM et UR) par la méthode de diffusion en puits d'agar décrite plus haut. Pour ce faire, le résidu organique sec est repris dans un minimum de méthanol (1 mL), alors que l'extrait aqueux est repris dans l'eau ultra pure. Des fractions de 0,1 mL chacune de l'extrait organique ou aqueux sont déposées dans chaque puits. Après diffusion et

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

incubation, la lecture des résultats est réalisée après 24 heures pour les deux bactéries, et 48 heures pour le champignon.

3. Purification des antibiotiques par HPLC

Les deux extraits aqueux et organique ont fait l'objet d'une purification par HPLC. La préparation des échantillons pour l'injection en HPLC se fait en solubilisant l'extrait sec dans 2 mL de méthanol pour l'extrait organique, et 2 mL d'eau ultra pure pour l'extrait aqueux. Chaque extrait est centrifugé puis filtré à travers un filtre-seringue (0,2 µm) et mis enfin dans des vials HPLC.

Appareillage et conditions de purification

Appareillage

L'équipement de chromatographie utilisé est fourni par Waters et dispose des éléments suivants :

- Injecteur de type Rhéodine 7725i relié à une boucle d'injection de 500 µL.
- Contrôleur : type Waters 600 controller.
- Système de pompe : type Waters 60F.
- Logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données : Empower 2.
- Colonne semi-préparative Waters XBridge C18 (10 × 200 mm, 5 µm) pour la purification de l'extrait organique. Cette colonne est précédée d'une pré-colonne Waters XBridge C18 (10 × 10 mm, 5 µm).
- Colonne semi-préparative amphiphile Atlantis Prep T3 (250 mm × 10 mm, 5 µm, Waters, Milford, MA) pour la purification de l'extrait aqueux.

Conditions de purification

La phase mobile est binaire. Elle est constituée par un éluant dégazé d'eau bidistillée (solvant A) et de méthanol (solvant B). Pour l'extrait organique, les conditions de séparation sont celles présentées dans le [Tableau 10](#). Le débit d'élution est fixé à 1,5 mL/min. La détection est faite à deux longueurs d'onde ; 220 et 260 nm.

Pour l'extrait aqueux, l'élution est faite conformément au programme du [Tableau 11](#), à un débit de 1,5 mL/min et une détection UV à 220 et 254 nm.

Tableau 10. Programme HPLC de purification de l'extrait organique.

	Temps (min)	Méthanol (solvant A %)	Eau (solvant B %)
'Pre-run' (équilibre de la colonne)	10	30	70
'Run' (gradient linéaire)	0,00	30	70
	40	100	0
'Post-run' (lavage)	50	100	0

Tableau 11. Programme HPLC de purification de l'extrait aqueux.

	Temps (min)	Eau (solvant A %)	Méthanol (solvant B %)
'Pre-run' (équilibre de la colonne)	10	100	0
'Run' (gradient discontinue)	0,00	100	0
	22	25	75
	38	0	100
	40	100	0
'Post-run' (lavage)	50	100	0

Avant l'injection des échantillons, la colonne est conditionnée et équilibrée avec les conditions initiales pendant 10 min. Lorsque la colonne est équilibrée, 50 µL de l'échantillon sont injectés. Toutes les fractions collectées pour les deux extraits sont concentrées à sec, récupérées dans un solvant approprié (méthanol ou eau), et testées par antibiographie (la méthode de diffusion des puits d'agar) contre SARM, BS et UR.

VI. CARACTERISATION PARTIELLE DES ANTIBIOTIQUES

1. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV-visible ont été effectués grâce au détecteur à barrette de diode de l'appareil HPLC, par un balayage de 190 à 500 nm.

2. Spectrométrie de masse

Les masses moléculaires des antibiotiques ont été déterminées au Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (France). Le spectromètre utilisé est le modèle LCQ iontrap (Finnigan MAT, San José, CA) avec la technique de "Nano-Electrospray Ionisation Masse Spectrometry" (ou Nano-ESI-MS) qui permet de déterminer le poids moléculaire (PM) des antibiotiques ainsi que ceux

des fragments qui en résultent après ionisation des ions parents. La technique de Nano-ESI-MS permet d'analyser de très faibles quantités de produit (quelques microgrammes). L'analyse est réalisée en mode positif et en mode négatif et le programme d'analyse utilisé est Xcalibur 1.2 de ThermoDuest (San Jose, USA).

3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton

Cette technique a pour objectif de déterminer la nature des atomes présents dans une molécule (H, C, N), leur nombre et leur enchaînement, et permet ainsi de connaître la structure totale d'une molécule.

Les études RMN ont été réalisées au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, CNRS) de Toulouse, avec un spectrophotomètre Bruker Avance 500, à 400 MHz. Les échantillons (2 mg pour chacun) ont été solubilisés dans 600 μ L de chloroforme deutérié ($CDCl_3$).

Pour nos échantillons, une cryosonde (sonde à antennes refroidies) reliée à une unité cryogénique à l'hélium, a été utilisée. Cet outil supplémentaire permet de multiplier par quatre la sensibilité et donc de diminuer d'un facteur 16 la durée des expériences.

Chapitre III

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTAGONISTES DE LA SOUCHE SA198 DE *Sx. TAMANRASSETENSIS*

1. Spectre d'activité de la souche SA198 de *Sx. tamanrassetensis*

1.1 Mise en évidence par la méthode des stries croisées

Les résultats des tests d'antagonisme *in vitro* contre différents germes cibles (bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif, levures et champignons) par la technique des stries croisées sur milieu ISP2 sont illustrés par les [Figures 21](#) et [22](#).

L'analyse préliminaire de l'activité antimicrobienne de la souche *Sx. tamanrassetensis* a montré un large spectre d'antagonisme contre la plupart des microorganismes testés ainsi que le montre bien la [Figure 21](#). La souche a présenté une activité antibactérienne contre certaines bactéries à gram positif, qui était modérée à forte (10-20 mm) avec SARM ATCC 43300 et faible (<10 mm) avec *Listeria monocytogenese* ATCC 13932 et SARM ATCC 25923. Les activités les plus élevées ont été observées contre *Staphylococcus aureus* 639c résistant à la méticilline (29 mm) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (21 mm). Cependant, aucune activité n'a été détectée contre les bactéries SARM ATCC 25922 et *Enterococcus* sp.. Chez les bactéries à Gram négatif, les activités étaient en général faibles (<10 mm) (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii*, *Agrobacterium* sp.), voire nulles (*Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91 et *Escherichia coli* ATCC 8739 toutes deux multirésistantes aux antibiotiques). Dans le cas des champignons, la souche *Sx. tamanrassetensis* a montré une activité positive contre seize des vingt champignons filamenteux testés. Alors qu'elle est particulièrement intéressante vis-à-vis d'*Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (23 mm), l'activité antifongique est faible à modérée contre la majorité et varie de 3 à 15 mm (*Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, *Penicillium expansum*, *P. glabrum*, *Aspergillus carbonarius* M333, *A. niger* OT304, *A. westerdijkiae*, *A. flavus* NRRL 3251, *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp. et *Botrytis cinerea*) ([Figure 21](#)). En revanche aucune activité n'a été relevée en présence de *Fusarium solani*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum* et *Aspergillus parasiticus* CBS 100926. L'activité antilevurienne est absente sauf dans le cas de *Candida tropicalis*, *C. pseudotropicalis* et *C. zeylanoides* où elle est faible (<10 mm). Une activité modérée (15 mm) a également été observée contre le mycoplasme *Ureaplasma parvum* ATCC 27813.

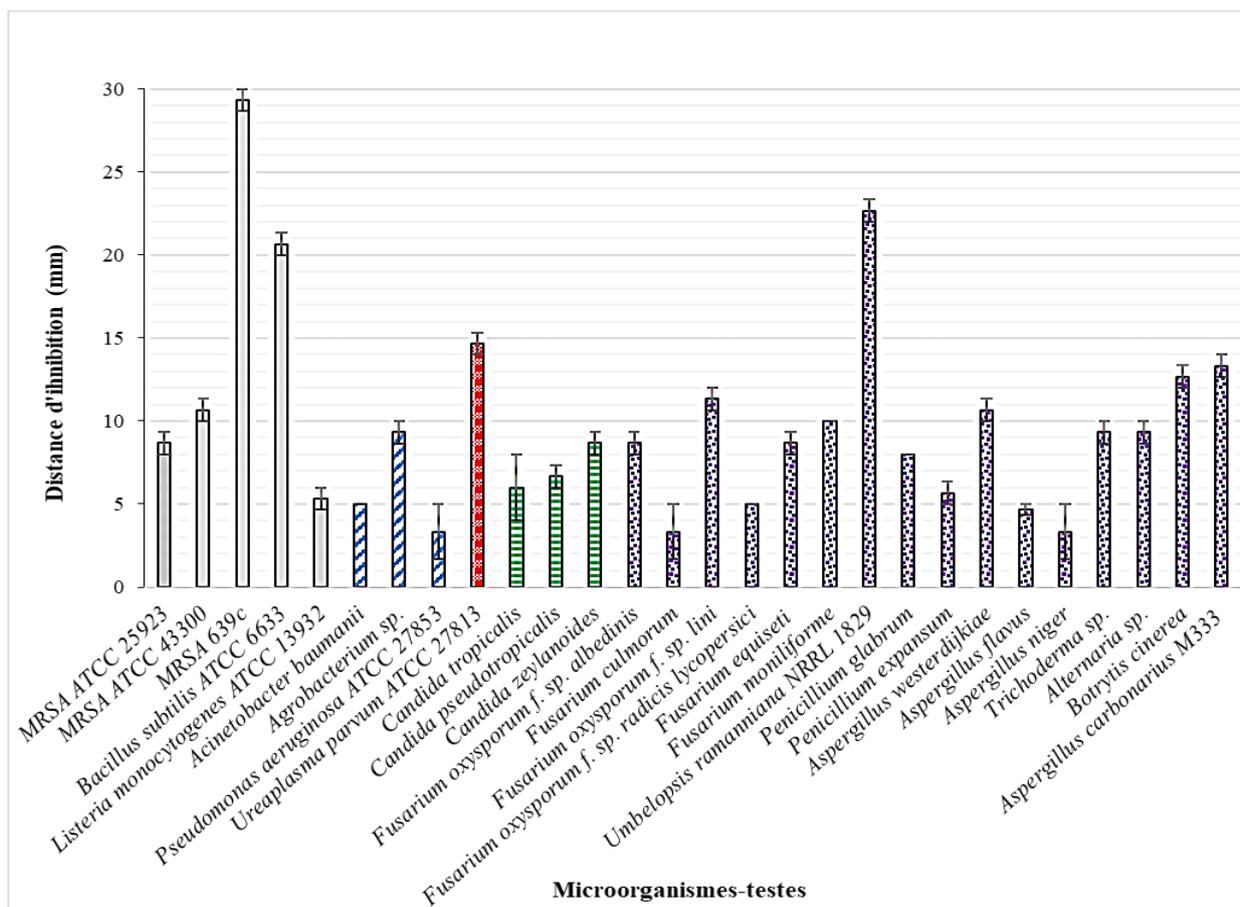


Figure 21. Activité antimicrobienne de *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 contre plusieurs microorganismes tests évaluée par la méthode des stries croisées.

Aucune activité n'est notée en présence des bactéries à Gram-négatif *Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91 et *Escherichia coli* ATCC 8739, des Gram-positif *Enterococcus* sp., et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ATCC 25923 ; des levures *Candida albicans* IPA200, *C. albicans* IPA988, *C. glabrata* et *C. guilliermondii*, et des champignons filamenteux *Fusarium solani*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum* et *Aspergillus parasiticus* CBS 100926. Les résultats représentent la moyenne ± erreur standard due à trois

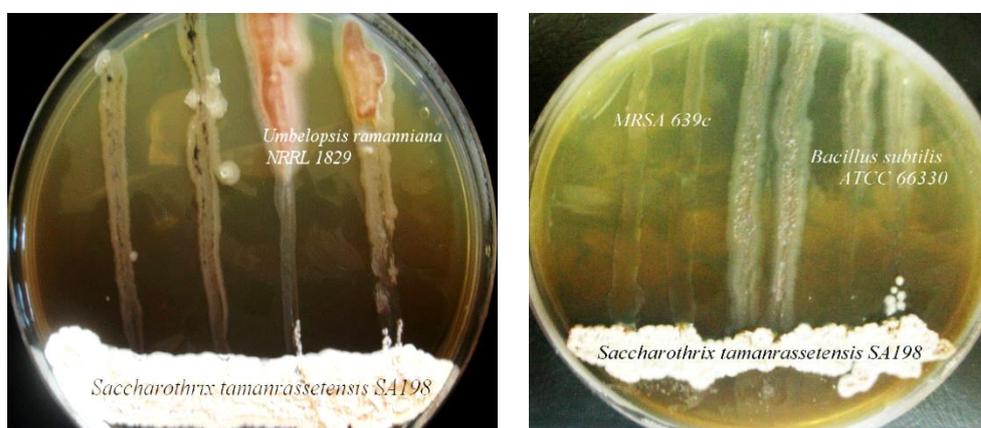


Figure 22. Photographie de l'inhibition microbienne de *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 évaluée par la méthode des stries croisées en présence des germes *Staphylococcus aureus* 639c résistant à la méticilline (MRSA) ; *Bacillus subtilis* ATCC 66330 et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829.

1.2. Mise en évidence par la méthode moléculaire : Recherche des gènes de biosynthèse des antibiotiques

Le potentiel de biosynthèse de la souche SA198 de *Sx. tamanrassetensis* à produire des antibiotiques a été évalué en amplifiant les gènes codant pour les polykétides synthases (PKS-I, PKS-II) et les peptides non ribosomiques synthétases (NRPS).

L'ADN a été isolé et amplifié à l'aide d'amorces spécifiques afin de détecter le domaine cétoynthase de PKS et le domaine d'adénylation de NRPS. La présence d'une bande à 700-800 de paires de bases (pb) indique la présence d'un domaine d'adénylation NRPS comme cela est indiqué dans la Figure 23. En revanche, aucune bande correspondante aux domaines PKS-I et PKS-II n'a été détectée. Ce résultat confirme le potentiel producteur d'antimicrobiens de la souche SA198.

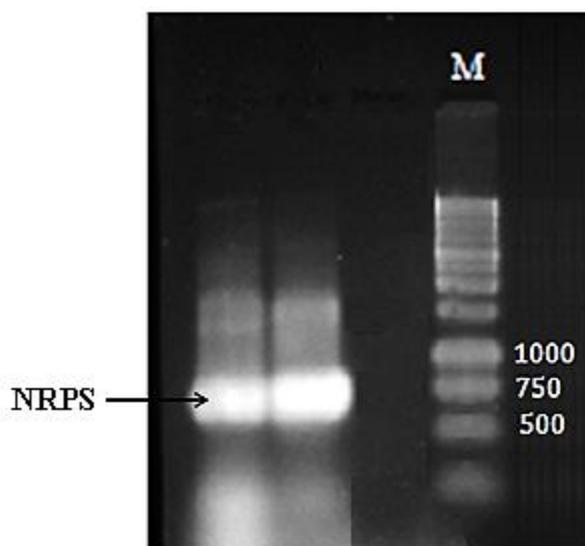


Figure 23. Détection par PCR du domaine NRPS pour *Sx. tamanrassetensis* SA198. Teste répété deux fois. M : marqueur de taille moléculaire (1 kb).

1.3. Discussion et conclusion

Le screening antimicrobien primaire de la souche *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 a montré une activité antimicrobienne intéressante. Cette souche possède des potentialités inhibitrices certaines avec un spectre large touchant aussi bien les bactéries, que les champignons et les levures. Ceci avait été déjà considéré lors des travaux menés par Boubetra (2013) qui avaient établi une activité contre plusieurs germes comme, les bactéries *Bacillus coagulans* ; *Enterococcus faecalis* ; *Listeria monocytogenes*, et le champignon *Ascochyta fabae*, alors que la souche de *Staphylococcus aureus* testée lors de ces travaux s'était montrée résistante à la souche SA198.

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Ce pouvoir antagoniste diversifié chez la souche SA198 de *Saccharothrix* se retrouve chez d'autres espèces du même genre et s'explique par le fait que les espèces de ce genre sont connues pour la production de nombreux antibiotiques ayant une grande diversité structurale avec des spectres d'action tout aussi intéressants (Boubetra, 2013; Bouznada, 2018; Badadi *et al.*, 2019). Plusieurs travaux dans le monde ont mis en évidence l'activité des molécules produites par les souches du genre *Saccharothrix* qui était principalement dirigée contre les bactéries à Gram positif, parfois contre les champignons et rarement contre les bactéries à Gram négatif (Braznikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979; Isshiki *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1992; Kinoshita *et al.*, 1999; Wang *et al.* 2000; Lamari *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2002; Zitouni *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2009; Kalinovskaya *et al.*, 2010; Aouiche *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2015; Ibeyaima *et al.*, 2017; Bouznada, 2018). Cela était le cas de la souche SA198, où l'essentiel de l'activité concernait le germe SARM 639c hautement pathogène pour l'être humain, mais aussi la souche testée de *Bacillus subtilis* ainsi que le champignon filamentueux *Umbelopsis ramanniana*.

L'activité antibactérienne enregistrée contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) est très intéressante. La résistance aux antibiotiques a été décrite chez de nombreux agents pathogènes dans divers contextes, y compris avec le SARM (Chambers, 2005; Gordon et Lowy, 2008; Liu *et al.*, 2011; Kaur et Chate, 2015; Guo *et al.*, 2020). Il a été rapporté que ce microorganisme était le deuxième agent étiologique responsable des infections du sang, des voies respiratoires inférieures et des infections cutanées (Moise et Schentag, 2000; Peebles *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018). La résistance antimicrobienne croissante a créé un besoin évident de développer de nouveaux antibiotiques avec de nouveaux mécanismes d'action. Cette tendance a été nombre de fois vérifiée notamment avec certaines actinobactéries isolées au sein de notre laboratoire (LBSM) (Zitouni *et al.*, 2004b; Bouras *et al.*, 2006a, 2007; Boudjella *et al.*, 2010; Meklat *et al.*, 2011; Driche *et al.*, 2017; Lahoum *et al.*, 2019).

Dans le cas des *Saccharothrix*, en dehors des travaux de Zitouni *et al.* (2005), Aouiche *et al.* (2012); Boubetra *et al.* (2013) dans le cas de cette même souche SA198 ou encore Ibeyaima *et al.* (2017), l'inhibition de bactéries à Gram négatif est un phénomène très rare. Dans notre cas l'activité était faible contre les bactéries à Gram négatif testées. Cependant, au regard du nombre faible de bactéries testées, ce résultat ne doit pas être sous-estimé ou ignoré pour de futures investigations. D'autres part, les bactéries à Gram négatif montrent toujours une certaine résistance comparativement aux bactéries à Gram positif (Prescott *et al.*, 2002). Les différences de structure au niveau de la paroi ainsi que la présence d'une enveloppe externe chez ces bactéries servant de barrière de perméabilité empêchent certains médicaments et antibiotiques de pénétrer dans la cellule (Silhavy *et al.*, 2010). Ces particularités structurales contribuent fortement aux phénomènes de

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

résistances intrinsèques aux antibiotiques observées chez les bactéries à Gram négatif. La mauvaise utilisation des antibiotiques, les thérapies antimicrobiennes trop longues et l'utilisation anarchique et non contrôlé des antibiotiques renforcent aussi cette résistance (Mkk *et al.*, 2018). Néanmoins, les bactéries à Gram négatif sont omniprésentes dans la nature et la pression sélective due à l'utilisation d'antibiotiques a considérablement aggravé ce phénomène de résistance au cours des deux dernières décennies (Eichenberger et Thaden, 2019). D'où l'intérêt à rechercher et étudier de nouvelles molécules antibiotiques.

L'activité antifongique manifestée contre *Aspergillus carbonarius* et *A. westerdijkiae*, qui sont des champignons mycotoxinogènes est très intéressante. En effet ces deux agents produisent de l'ochratoxine A, une toxine assez dangereuse pour l'homme et les animaux, pouvant provoquer des empoisonnements, des déficits immunitaires et même des cancers (Da Rocha *et al.*, 2014). *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* sont des agents phytopathogènes. Le premier est l'agent du pourrissement vasculaire (fusariose) du palmier dattier et provoque d'importantes dégradations au niveau des fruits (El Modafar, 2010; Benzohra *et al.*, 2015). Quant au second agent, il est responsable de l'une des maladies les plus dévastatrices des champs de tomates. Ces résultats révèlent que *Sx. tamanrassetensis* SA198 peut être considérée comme une candidate potentiellement prometteuse pour la production de nouveaux antibiotiques.

Dans un second test, la capacité de la souche *Sx. tamanrassetensis* à produire une activité antimicrobienne a été estimée par une analyse PCR pour la présence de gènes spécifiques codant pour les polykétides synthétases (type I et type II) et NRPS. Une amplification PCR s'est révélée positive pour le domaine NRPS, contrairement aux séquences PKS qui n'ont pas été détectées. Les clusters de gènes biosynthétiques PKS-I, PKS-II et NRPS des microorganismes jouent un rôle fondamental dans la biosynthèse de produits naturels (Rutledge et Challis, 2015). Ceci explique l'intérêt que consacrent nombre de chercheurs à ces séquences lorsqu'ils explorent les génomes microbiens (Nikolouli et Mossialos, 2012; Baltz, 2017). La majorité des composés bioactifs connus a été biosynthétisée par des actinobactéries en impliquant des clusters de gènes tels que les PKS et les NRPS (Benzohra *et al.*, 2015; Jackson *et al.*, 2018). La détection des gènes NRPS chez la souche SA198 peut être la preuve du potentiel élevé des actinobactéries extrémophiles à produire un grand nombre de métabolites secondaires bioactifs (Saker *et al.*, 2015). Signalons que, des études chez des souches d'actinobactéries ont révélé que les gènes codant pour les PKS-I sont les moins fréquents (Qin *et al.*, 2009; Meklat *et al.*, 2011; Saker *et al.*, 2015). Toutefois, l'absence des gènes PKS ne remet pas en cause la présence d'une activité antagoniste de la souche SA198, car il existe d'autres mécanismes biosynthétiques autres pouvant induire la production de l'activité antimicrobienne (Liu *et al.*, 2016).

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les informations apportées sur la voie de biosynthèse impliquée dans la production d'un métabolite secondaire peuvent aider à prévoir la structure chimique du métabolite synthétisé. Des recherches intensives sur ces enzymes ont permis d'identifier et de caractériser plus de 23000 produits naturels issus des PKS et des NRPS et qui ont été largement utilisés en médecine comme antibiotiques et agents antitumoraux (Amoutzias *et al.*, 2008; Newman et Cragg, 2012; Kat *et al.*, 2016).

Les actinobactéries du sol sont une source potentielle de nouveaux PKs et PNRs (Fenical et Jensen, 2006; Bull et Stach, 2007). Cependant, les clusters de gènes biosynthétiques PKS et NRPS des souches des sols sahariens algériens ont rarement été signalés. Il est à supposer que le gène NRPS détecté chez *Sx. tamanrassetensis* pourrait avoir un lien avec les activités antibactériennes et antifongiques observées chez cette espèce contre les microorganismes cibles. Plus encore, cela pourrait suggérer la possibilité que les biomolécules impliquées dans ces activités soient de nature peptidique ou polypeptidique.

Les produits naturels biosynthétisés par les NRPS comptent parmi les médicaments les plus importants actuellement utilisés en clinique pour le traitement de diverses maladies. Ils englobent pour les plus importants des antibactériens, des antifongiques, des antiviraux, des immunosuppresseurs et même des antitumoraux (Felnagle *et al.*, 2008). Comme exemples d'application d'antibiotiques NRPS il y a la capréomycine produite par *Saccharothrix mutabilis* subsp. *Capreolus* ATCC 23892. Elle est utilisée en médecine humaine comme antibiotique antituberculeux et est un composant essentiel de l'arsenal médicamenteux pour le traitement de la tuberculose multirésistante (Felnagle *et al.*, 2007). La daptomycine produite par *Streptomyces roseosporus* NRRL11379 et utilisée pour le traitement des infections cutanées causées par des agents pathogènes à Gram positif, y compris *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et à la vancomycine (Kirkpatrick *et al.*, 2003; Baltz *et al.*, 2006), ainsi que pour le traitement de la bactériémie et de l'endocardite (Fowler *et al.*, 2006). Les cyclosporines sont un autre exemple de NRPS produites par l'espèce fongique *Tolypocladium inflatum* et dont la cyclosporine A possède les activités biologiques les plus intéressantes (Dreyfuss *et al.*, 1976). Initialement étudiée en tant que fongicide potentiel, la cyclosporine A a ensuite été reconnue comme un puissant agent anti-inflammatoire et immunosuppresseur en supprimant l'activation des lymphocytes T (Borel *et al.*, 1976). Cette activité a permis son utilisation en clinique dans les chirurgies de transplantation pour prévenir le rejet de greffe, mais aussi dans le traitement des maladies auto-immunes (Borel *et al.*, 1976; Morris, 1984). La vancomycine et la teichoplanine sont des glycopeptides et deux médicaments cliniquement reconnus. La vancomycine, produite par l'actinobactérie *Amycolatopsis orientalis*, est utilisée contre certaines infections à *Staphylococcus aureus* résistantes à la

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

méticilline, et est également utilisée pour traiter les infections graves ainsi que l'endocardite causées par des *Staphylococcus*, des *Streptococcus* et des *Corynebacterium* (Williams, 1996; Mookadam *et al.*, 2006). La teichoplanine, produite par *Actinoplanes teichomyceticus*, est utilisée contre les entérocoques résistants à la vancomycine (Kahne *et al.*, 2005). Les bléomycines sont une famille de peptides glycosylés qui se sont révélés avoir des activités anticancéreuses (Umezawa, 1965; Umezawa *et al.*, 1966).

En conclusion, le résultat du screening moléculaire encourage de futures investigations en vue d'exploiter les produits NRPS de la nouvelle souche saharienne *Sx. tamanrassetensis* pour le développement et la découverte de nouveaux antibiotiques potentiels.

A l'issue de cette étude, nous constatons que la souche SA198 présente une activité antibiotique. Pour la suite du travail, nous retenons, les souches les plus sensibles, *Staphylococcus aureus* 639c résistant à la méticilline (SARM), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et le champignon *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (UR), comme indicateurs pour la détermination des activités antimicrobiennes dans le processus d'élaboration d'un milieu de production optimal des antibiotiques produits par la souche SA198.

II. PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE EN MILIEUX DE CULTURE AGITES

Dans l'optique de sélectionner un milieu de production des antibiotiques de la souche SA 198, une première étape a consisté à rechercher la meilleure source d'azote et de carbone à ajouter au milieu de base. Pour ce faire, deux groupes de cinétiques ont été conduites dans des fioles Erlenmeyers en condition d'agitation et suivies durant 10 jours.

Dans le premier groupe de cinétiques, le milieu de culture synthétique de base se compose de glucose à 1% comme source de carbone à laquelle est associée séparément seize sources d'azote différentes : Corn steep liquor, extrait de levure, extrait de malt, peptone de caséine, caséine, sulfate d'ammonium, tryptone, L-proline, L-tyrosine, L-alanine, arginine, valine, leucine, méthionine, cystine et lysine. En tout, seize milieux de culture différents sont expérimentés. La meilleure source d'azote est retenue pour mener le deuxième groupe de cinétique.

Le deuxième groupe de cinétiques consiste à utiliser la meilleure source d'azote et faire varier huit sources de carbone : Glucose, dextrines, fructose, saccharose, propionate, pyruvate, succinate et acétate de sodium. Dans ce groupe huit milieux de cultures différents sont évalués.

Chaque milieu est répété trois fois et chaque résultat représente la moyenne de trois essais. Les cinétiques sont réalisées dans les mêmes conditions, à savoir la taille et l'âge de l'inoculum, les

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

conditions de culture (température, pH, volume du milieu et agitation) ainsi que les méthodes d'analyses.

La production d'antibiotiques est évaluée par la méthode de diffusion des puits en utilisant trois germes cibles choisis parmi les plus sensibles, qui sont les bactéries ; *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline SARM 639c (SA) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (BS) et le champignon ; *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (UR). La croissance est évaluée par mesure du poids sec de la biomasse (en g/L de milieu), et le pH est mesuré dans le filtrat de culture.

1. Cinétique de production avec différentes sources d'azote

Résultats

Dans ce groupe de cinétique, seize sources d'azote différentes ont été étudiées pour leur influence sur la production de l'activité antimicrobienne par la souche de *Sx. tamanrassetensis*.

Chacune des seize sources d'azote a été testée séparément et associée à chaque fois au glucose en tant que seule source de carbone dans le milieu de base (MB-Glc).

Durant cette série de cinétiques, il a été constaté que l'ajout de certaines sources d'azote, n'avait pas permis la détection d'une activité antimicrobienne (activités nulles). C'est le cas notamment de la L-proline, la cystine, la méthionine et la lysine et ce, contre les trois germes testés.

Pour permettre une appréciation claire et synthétique des résultats, nous avons focalisé uniquement sur les sources ayant permis la détection d'une activité antimicrobienne. Les résultats de ces cinétiques sont illustrés par les [Figures 24](#) et [25](#).

1.1. Milieu de base-glucose additionné de corn steep liquor

Les résultats ([Figure 24a](#)) montrent une activité antifongique contre UR dès le 2^{ème} jour (phase exponentielle) de fermentation et qui évolue en parallèle avec la croissance cellulaire jusqu'à atteindre un maximum de 24 mm au 8^{ème} jour (phase stationnaire) avec une biomasse maximale de 9,65 g/L. L'activité antibactérienne apparaît au 3^{ème} jour (phase exponentielle), avec une activité inférieure à celle observée en présence de UR. Toutefois l'évolution de l'activité antibactérienne est en corrélation avec celle de la croissance et atteint des maxima d'activité de 22 mm et 18 mm contre SA et BS respectivement au 8^{ème} jour (phase stationnaire). Le pH neutre au démarrage de la fermentation a tendance à s'alcaliniser et se stabiliser autour de 8,34 correspondant aussi aux meilleures activités obtenues.

1.2. Milieu de base glucose additionné de la peptone

L'activité contre UR (Figure 24b), apparaît le 3^{ème} jour (phase exponentielle) alors que celle contre SA et BS est tardive seulement le 5^{ème} jour (phase exponentielle). Elle est maximale au 8^{ème} jour (phase stationnaire) avec 24 mm contre UR, 21 mm contre SA et 16 mm contre BS. L'activité demeure plus ou moins stable après ces maximas (phase de déclin). Le maximum de croissance est noté le 8^{ème} jour avec une biomasse de 7,88 g/L. La courbe du pH dans ce milieu montre de légères variations durant la cinétique. Le pH initial qui était à 7,22 évolue lentement et atteint 7,70 au 10^{ème} jour.

1.3. Milieux base-glucose additionnés d'extrait de levure ou de valine

L'addition d'extrait de levure (Figure 24c) ou de valine (Figure 24d), n'a pas initié d'inhibition contre la bactérie BS et les activités sont restées nulles. Toutefois, l'activité était présente contre SA et UR dès le 3^{ème} jour (phase exponentielle).

Dans le milieu additionné d'extrait de levure (Figure 24c), l'activité antibactérienne (contre SA) et antifongique (contre UR) évolue de manière parallèle et progressive du 3^{ème} au 6^{ème} jour (phase exponentielle). Le maximum d'activité est atteint le 7^{ème} et le 8^{ème} jour (phase stationnaire) contre SA et UR avec 20 mm et 22 mm respectivement. Ces activités demeurent stables durant la phase stationnaire puis faiblissent en fin de cinétique au 10^{ème} jour (phase de déclin).

Dans le milieu avec la valine (Figure 24d), l'activité antimicrobienne évolue plus lentement entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour (phase exponentielle) jusqu'à atteindre un maximum le 7^{ème} jour (phase stationnaire) de 20 mm contre SA et de 18 mm contre UR. Ces activités diminuent au 9^{ème} et 10^{ème} jour (phase de déclin). Les niveaux de croissance maximum apparaissent au 7^{ème} jour avec les deux sources d'azote et sont 4,84 g/L avec l'extrait de levure et 4,60 g/L avec la valine. Le maximum d'activité correspond à un pH de 7,70 avec l'extrait de levure et de 7,96 avec la valine.

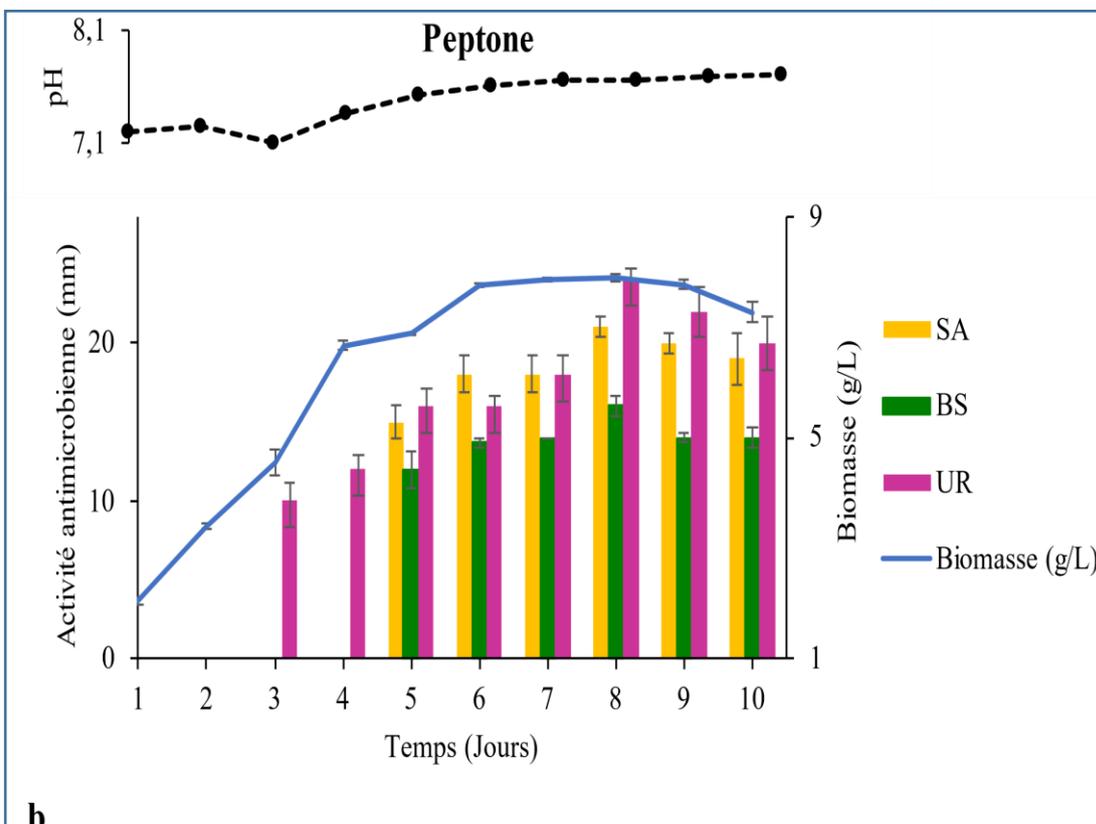
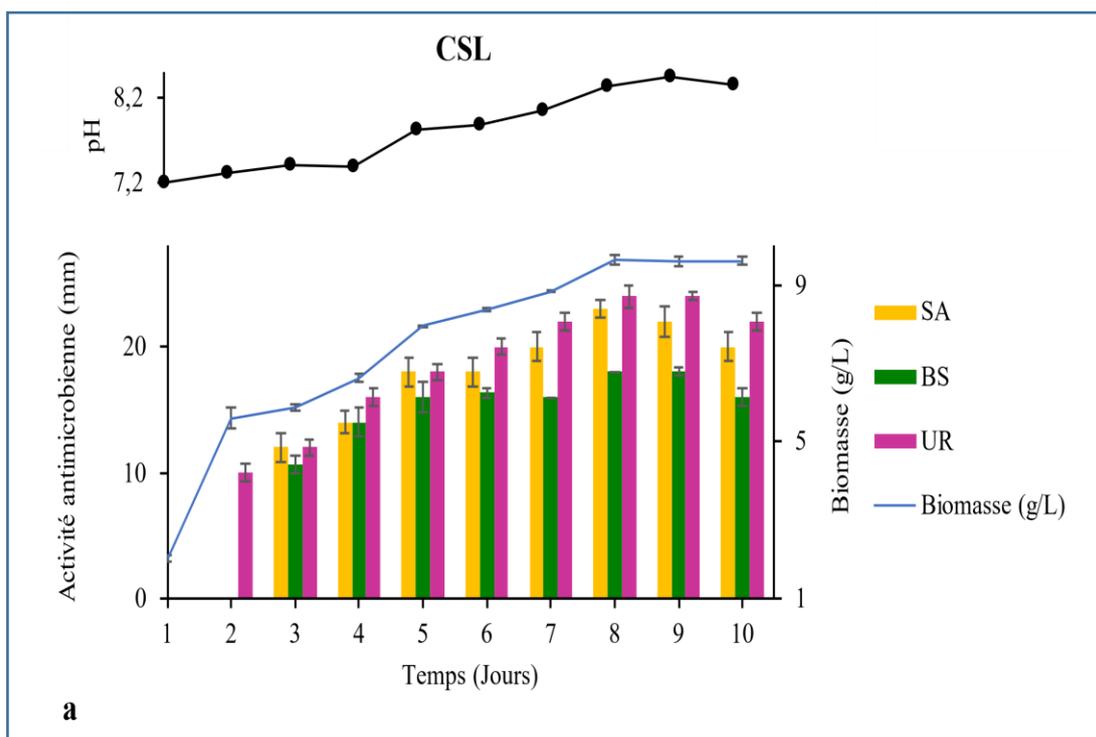
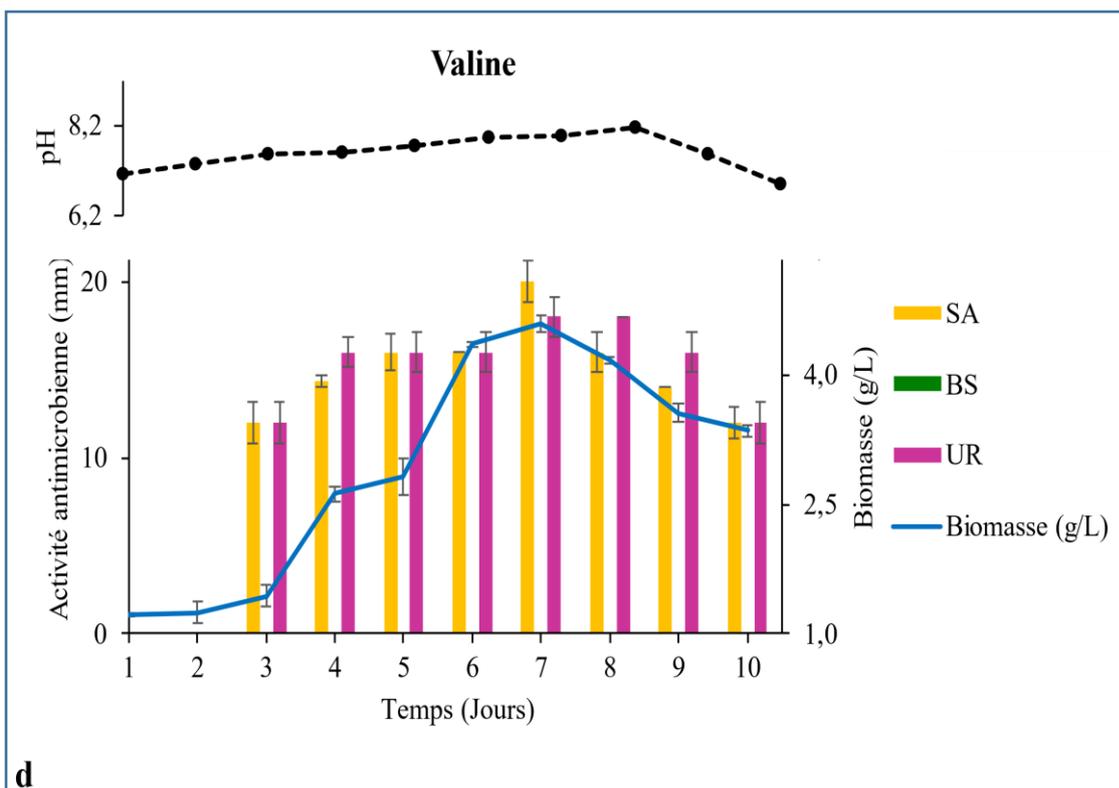
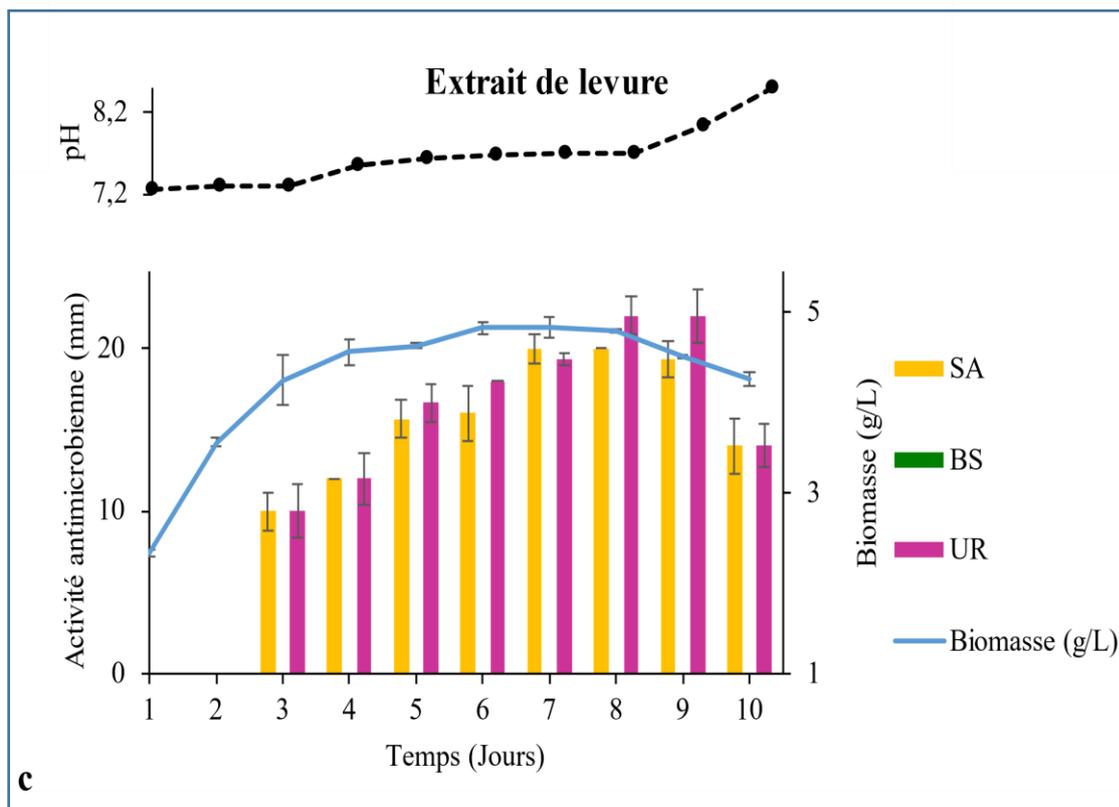


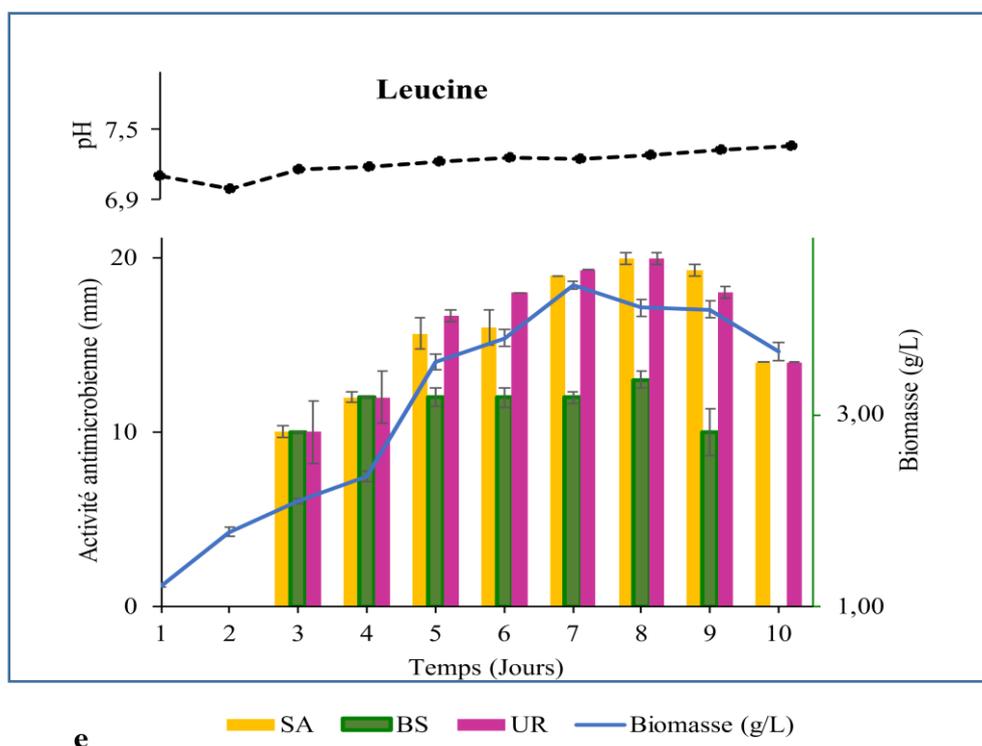
Figure 24. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-Glc en présence de corn steep liquor (a) ou de peptone (b).



Suite de la Figure 24. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-Glc en présence d'extrait de levure (c) ou de valine (d).

1.4. Milieu de base-glucose additionné de leucine

L'activité vis-à-vis des trois germes tests (Figure 24e), apparaît le 3^{ème} jour (phase exponentielle). Elle est maximale au 8^{ème} jour (phase stationnaire) avec 20 mm contre UR et SA et 13 mm contre BS. L'activité est encore présente au 9^{ème} jour puis faiblie au 10^{ème} jour (phase de déclin). La croissance la plus élevée est notée le 7^{ème} jour avec 4,35 g/L. Le pH initial de 7,10 ne varie pas beaucoup et demeure en dessous de 7,50 en fin de cinétique.



Suite de la Figure 24. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-Glc en présence de leucine (e).

1.5. Milieux de base-glucose additionnés d'extrait de malt ou de caséine

Les résultats (Figure 25) montrent tout comme avec les précédentes sources azotées des maximas d'activité aux derniers jours de la cinétique et autour du 8^{ème} jour.

A l'exception de BS (Figure 25b), dans le cas de SA (Figure 25a) tout comme UR (Figure 25c), l'activité antimicrobienne apparaît dès le 3^{ème} jour (phase exponentielle). Bien que les niveaux d'activité (Figure 25) soient inférieurs à ceux des cinq sources azotées citées précédemment, des maximas sont notés. En présence d'extrait de malt les maximas sont de 15 mm contre SA au 8^{ème} jour et de 12 mm et 16 mm contre BS et UR respectivement au 7^{ème} jour (phase stationnaire). Quant à la caséine, son addition enregistre des maximas de 14 mm et 17 mm contre SA et UR

respectivement au 8^{ème} jour (phase stationnaire) et de 17 mm contre BS au 10^{ème} jour (phase de déclin).

Durant cette série de cinétique les taux de croissance maximum (Figure 25d) sont 4,96 g/L au 8^{ème} jour avec l'extrait de malt et 3,96 g/L avec la caséine. On note que l'évolution de la croissance suit plus ou moins celle de la production et peuvent être de ce fait associées (Figure 25).

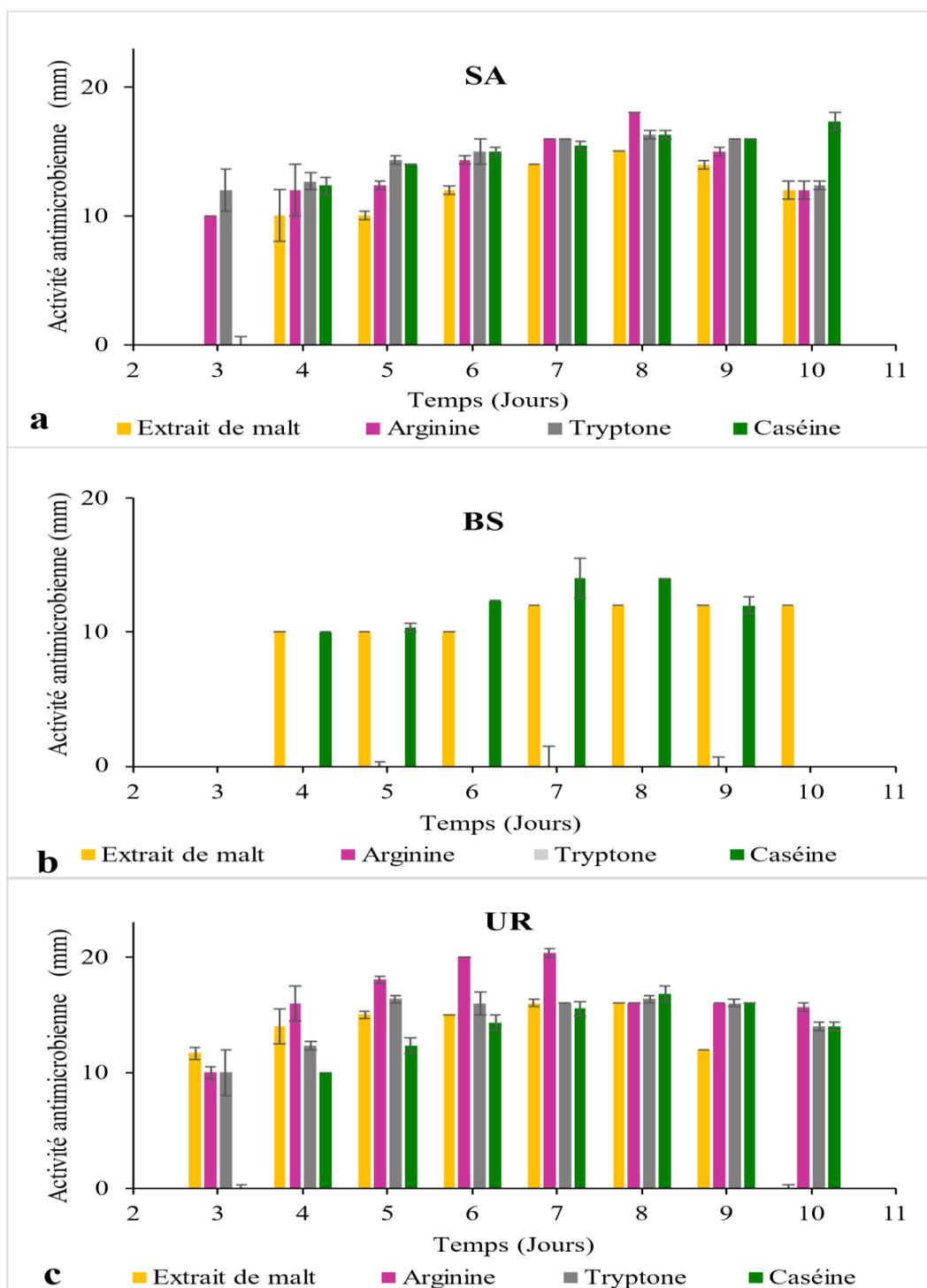
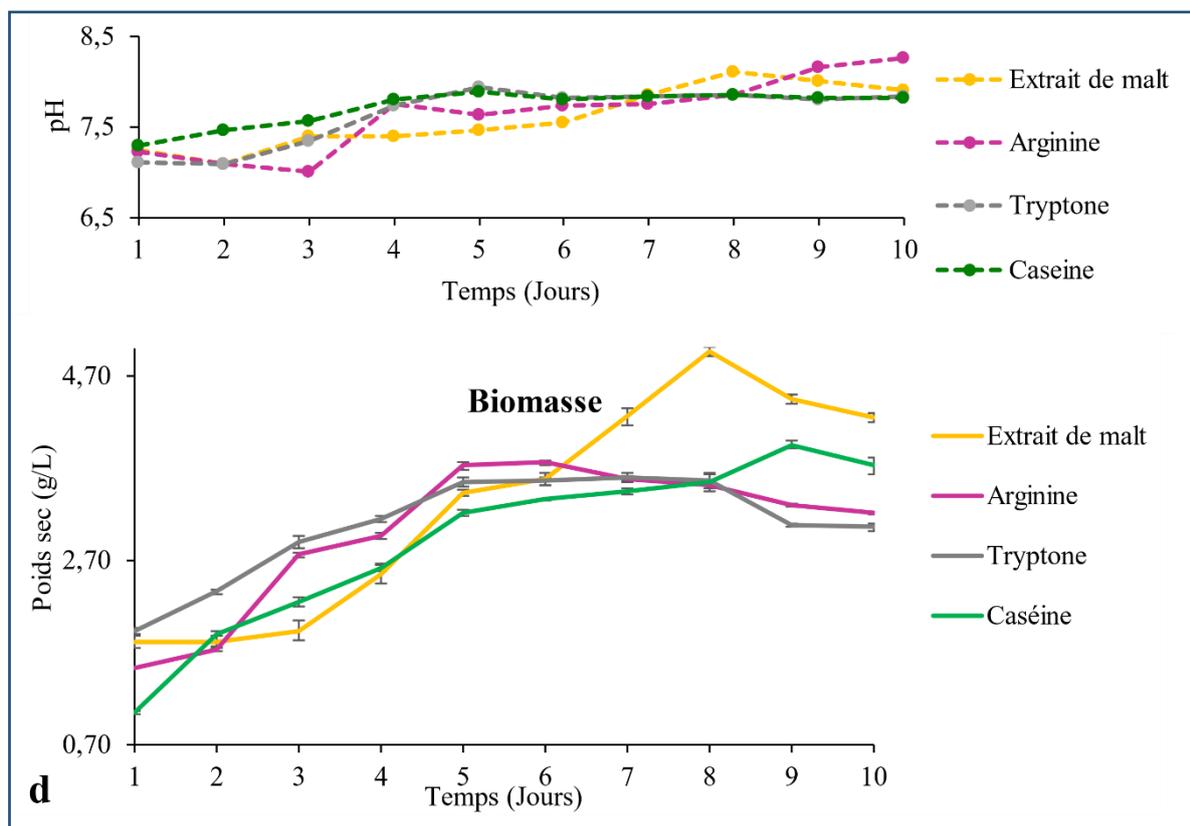


Figure 25. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes contre SA (a), BS (b) et UR (c) de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-Glc en présence d'extrait de malt ou de caséine ou d'arginine ou de tryptone.

Pour la cinétique de pH (Figure 25d), nous notons qu'en présence d'extrait de malt le pH initial qui était de 7,25 évolue lentement et atteint 8,00 le 10^{ème} jour. En présence de caséine, le pH n'a augmenté que légèrement. Le pH initial était de 7,30 et le pH final 7,80.



Suite de la Figure 25. Cinétiques de croissance et de pH de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-Glc en présence d'extrait de malt ou de caséine ou d'arginine ou de tryptone.

1.6. Milieux de base-glucose additionnés d'arginine ou de tryptone

Les résultats présentés sur la Figure 25, révèlent que ces deux fermentations, n'ont pas permis d'obtenir une inhibition contre la bactérie BS (Figure 25b). L'activité antimicrobienne est détectée le 3^{ème} jour (phase exponentielle) contre UR et SA et en présence des deux sources.

Dans le milieu avec arginine, les valeurs maximales observées sont de 18 mm contre SA au 8^{ème} jour (phase stationnaire) et de 20 mm contre UR au 6^{ème} jour (phase stationnaire) (Figures 25a, c, d). Cette activité antifongique tend à diminuer après le 7^{ème} jour jusqu'à atteindre une zone d'inhibition de 16 mm au 8^{ème}, 9^{ème} et 10^{ème} jour (phase de déclin).

Dans le milieu additionné de tryptone la meilleure activité antimicrobienne est de 16 mm contre UR mais également contre SA. Alors que dans le cas de UR, ce maxima apparaît le 5^{ème} jour (phase stationnaire), pour SA il est noté le 7^{ème} jour (phase stationnaire) (Figures 25a, c, d). On note

que cette activité dans le cas de UR comme dans celui de SA demeure quelque peu stable puis faiblie au 10^{ème} jour (Figures 25a, c). Globalement on voit que dans le cas des deux sources là encore la production est liée à la croissance et a lieu à des pH légèrement basique (Figure 25d). Pour la cinétique de pH (Figure 25d), il est observé qu'en présence d'arginine le pH initial qui était de 7,22 évolue lentement et atteint 8,25 le 10^{ème} jour. En présence de tryptone le pH initial était de 7,11 puis la courbe monte légèrement jusqu'à 7,94 coïncident avec la meilleure activité pour diminuer légèrement en fin de cinétique à un pH final 7,83 (Figure 25d).

1.7. Milieux de base-glucose additionnés de tyrosine ou d'alanine ou de sulfate d'ammonium

L'addition de ces trois sources séparément au milieu de base avec glucose, n'a pas permis d'obtenir des activités intéressantes. En effet aucune inhibition contre le champignon UR n'a pu être obtenue. Les activités antibactériennes contre SA et BS étaient présentes mais très faibles. L'apparition de l'activité antibactérienne était tardive à partir du 4^{ème} jour avec le sulfate d'ammonium et du 6^{ème} jour avec les deux acides aminés. Par ailleurs, les activités étaient faibles ≤ 12 mm en présence de la tyrosine, ≤ 14 mm en présence de l'alanine et, ≤ 16 mm en présence du sulfate d'ammonium (données non présentées). Le taux de croissance était aussi faible pas plus de 2 g/L et ce avec les trois sources. Le pH a faiblement évolué avec une tendance à l'acidification en présence des deux acides aminés. En présence du sulfate d'ammonium le pH a évolué vers des pH alcalins.

1.8. Milieux de base-glucose additionnés de proline ou de méthionine ou lysine ou cystine

Dans ces milieux de base avec glucose supplémentés d'une de ces sources azotées il n'a été noté aucune activité antimicrobienne (contre SA, BS et UR).

➤ Choix de la meilleure source d'azote

Les résultats avec les différentes sources d'azote ont été regroupés et exprimés par souche-cible en considérant les meilleures activités au jour de production optimale et ce sous forme d'histogrammes dans la Figure 26.

La Figure 26a représente les meilleures activités antifongiques observées contre UR. Cette Figure montre que le milieu supplémenté de CSL est le meilleur, avec une valeur maximale de zone d'inhibition de 26 mm. Il est suivi de la peptone et l'extrait de levure, la leucine et l'arginine suivi de la valine puis de la caséine et de la tryptone.

La Figure 26b, regroupe les résultats de l'activité antibactérienne contre SA et BS. Elle montre aussi que le milieu avec corn steep a été le meilleur pour la production antibactérienne contre les bactéries *Staphylococcus aureus* (22 mm) et *Bacillus subtilis* (18 mm). Il est suivi par l'activité contre SA en présence de peptone puis l'extrait de levure et la leucine et contre BS par l'activité en présence de peptone puis la caséine et la leucine.

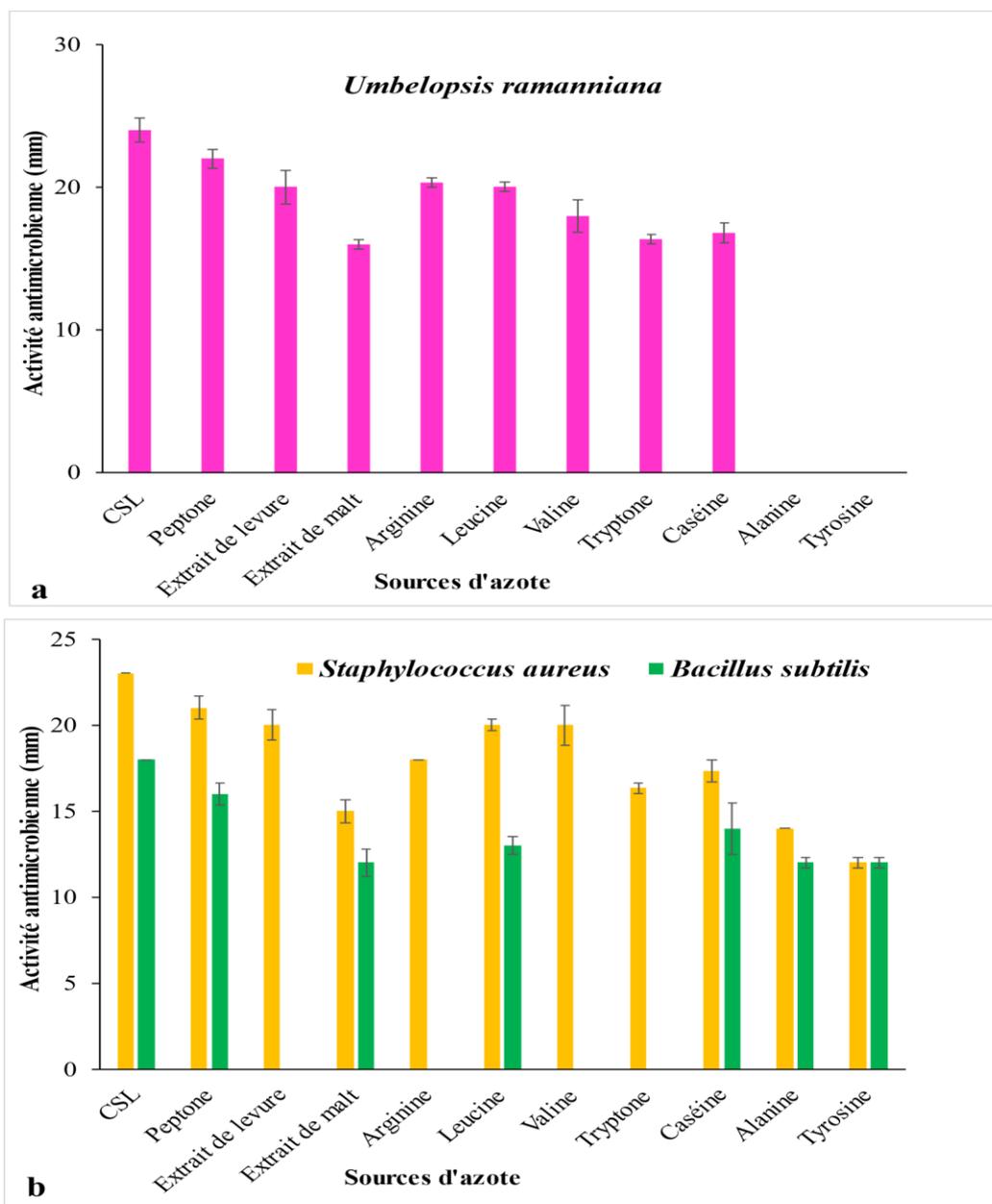


Figure 26. Activités antimicrobiennes contre UR (a) ; SA et BS (b) au jour de production optimale de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-Glc additionné de différentes sources d'azote.

Parmi les seize sources d'azotes testées (corn steep, extrait de levure, extrait de malt, peptone de caséine, caséine, sulfate d'ammonium, tryptone, L-proline, L-tyrosine, L-alanine, arginine, valine,

leucine, méthionine, cystine et lysine), le corn steep s'est révélé être le meilleur. Le corn steep est retenu comme source d'azote pour la cinétique suivante.

2. Cinétique de production avec différentes sources de carbone

Résultats

Pour cette série de cinétique, huit sources de carbone différentes ont été testées. Elles ont été ajoutées séparément au milieu de base synthétique contenant le CSL à 5% (MB-CSL) comme source d'azote. La production de l'activité antimicrobienne par la souche de *Sx. tamanrassetensis* a été évaluée contre les trois germes (SA, BS et UR), afin de déterminer la source carbonée permettant la meilleure production d'activité.

Comme cela était le cas lors des cinétiques de recherche de la meilleure source d'azote, l'ajout de certaines sources n'a pas été concluant ou n'a pas permis une production d'activité antimicrobienne. Le propionate est le nutriment qui a été le moins convaincant avec des activités nulles en présence des trois germes cibles.

Les résultats de ce groupe de cinétique sont illustrés par les [Figures 27](#) et [28](#).

2.1. Milieu de base-CSL additionné de glucose

La [Figure 27a](#), montre que comme cela était le cas précédemment en présence de nombre de sources d'azote, l'activité antimicrobienne se manifeste au 2^{ème} (contre UR) ou 3^{ème} (contre SA et BS) jour (phase exponentielle) et atteint des maxima en fin de cinétique (fin de la phase stationnaire). Le maximum d'activité est noté au 8^{ème} jour avec 22 mm contre SA et UR et 18 mm contre BS. Les meilleures activités notées coïncident avec le taux de croissance maximal atteint dans cette culture à savoir 8,96 g/L et un pH initial de 7,27 ayant évolué à 8,50 en fin de cinétique.

2.2. Milieu de base-CSL additionné de fructose

Dans la [Figure 27b](#) l'activité vis-à-vis des trois germes tests apparaît le 2^{ème} jour (phase exponentielle). Elle est particulièrement importante contre UR dont le maximum est de 28 mm suivi de SA avec 24 mm puis BS avec 20 mm et ce au 8^{ème} jour (phase stationnaire). L'activité demeure relativement stable au 9^{ème} jour puis faiblie au 10^{ème} jour (phase de déclin). La croissance la plus élevée est de 10,50 g/L le 7^{ème} jour. Le pH initial de 7,30 a eu tendance à augmenter légèrement pour marquer un plafond de 8,30 en fin de cinétique.

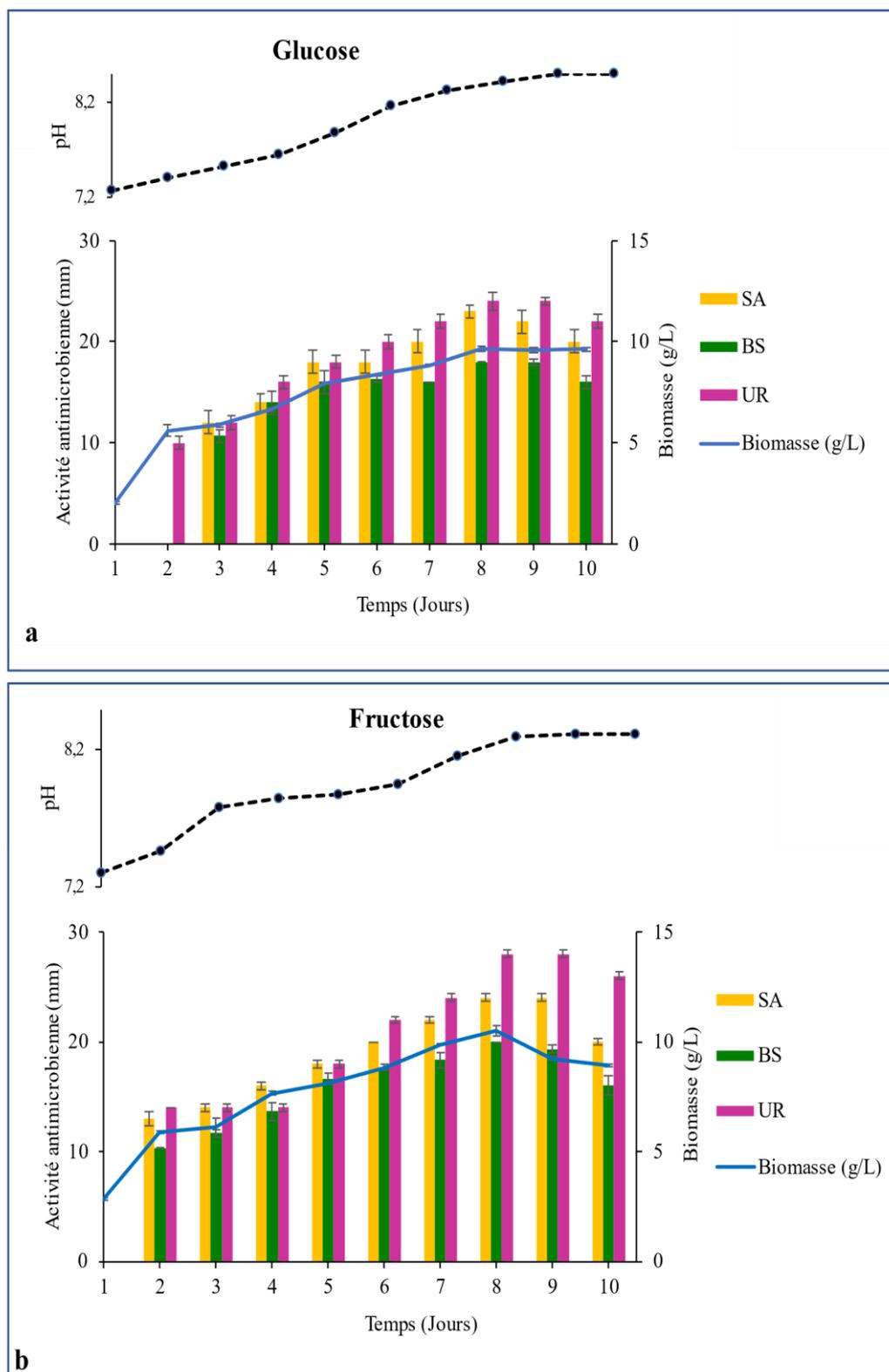
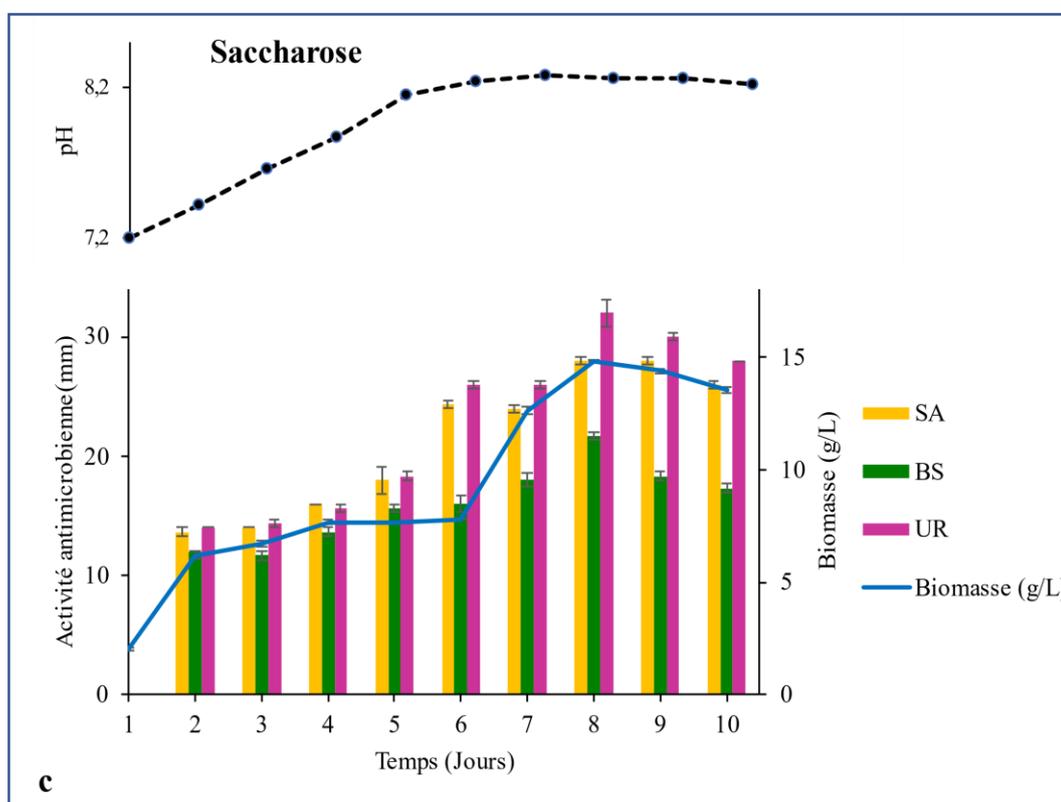


Figure 27. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-CSL en présence de glucose (a) ou de fructose (b).

2.3. Milieu de base-CSL additionné de saccharose

Dans ce milieu de fermentation et en présence du saccharose (Figure 27c), une forte activité antifongique contre UR est observée. L'activité antimicrobienne se manifeste le 2^{ème} jour (phase exponentielle), elle est moyenne puis d'une manière croissante augmente jusqu'au 6^{ème} jour pour atteindre 26 mm, 24 mm et 16 mm contre UR, SA et BS respectivement. Cette activité marque son maximum le 8^{ème} jour (phase stationnaire) avec des valeurs de 32 mm, 28 mm et 22 mm contre UR, SA et BS respectivement. Il s'agit là des meilleures activités obtenues de toutes les cinétiques réalisées. L'activité reste stable jusqu'à la fin de la cinétique. La courbe de croissance évoluant progressivement en début de cinétique marque un rebond au 6^{ème} jour parallèlement aux fortes activités enregistrées. La plus forte quantité de biomasse atteinte est de 14,80 g/L, c'est aussi le taux de croissance le plus élevé que l'on ait noté durant ces cinétiques. Le pH initial de 7,20 évolue lentement pendant la fermentation puis se stabilise autour de 8,20 à compter du 6^{ème} jour ne dépassant pas les 8,28 en fin de fermentation.



Suite de la Figure 27. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-CSL en présence de saccharose (c).

2.4. Milieu de base-CSL additionné de dextrines ou de succinate ou de pyruvate ou d'acétate de sodium ou de propionate

La Figure 28 regroupe les résultats observés en présence de ces quatre sources carbonées. À l'exception du milieu additionné de propionate où aucune activité n'a été observée, en présence des quatre autres sources l'apparition de l'activité est tardive, le 3^{ème} jour (phase exponentielle) et ce contre les trois germes-tests. Les niveaux d'activités sont aussi beaucoup plus faibles que ceux observés avec les trois sources de carbone précédentes. Avant le 6^{ème} jour d'incubation, la majorité des sources marquent de très faibles activités ≤ 12 mm (dextrines, succinate, acétate de sodium) (Figures 28a, b et c).

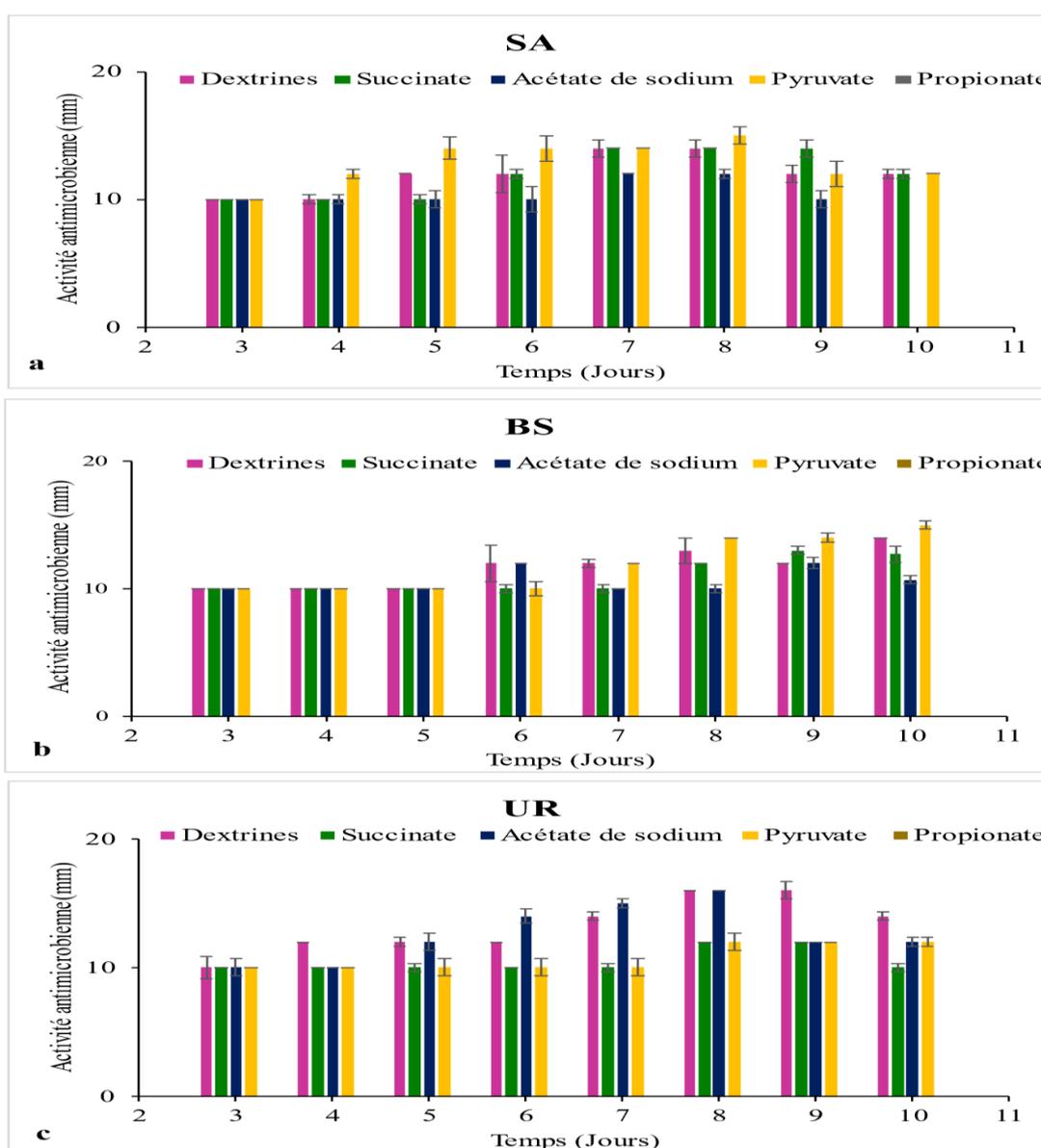
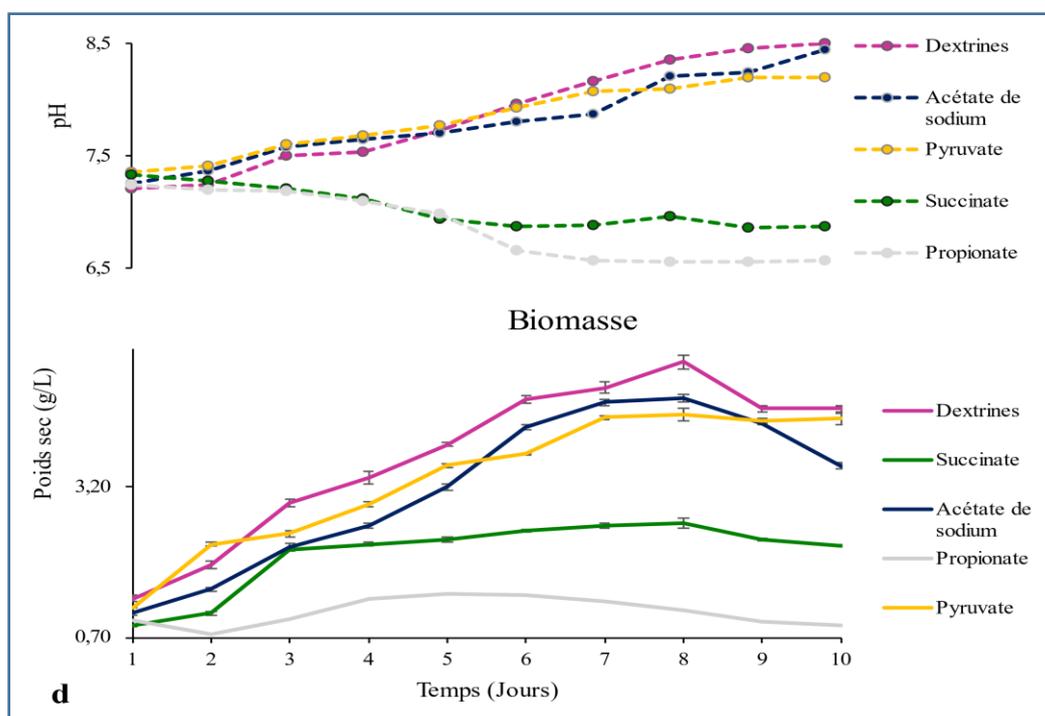


Figure 28. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes contre SA (a), BS (b) et UR (c) de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-CSL en présence de dextrines ou de succinate ou d'acétate de sodium ou de pyruvate ou de propionate.

Les maximas sont notés en fin de fermentation comme dans les cas précédents. L'activité la plus importante est notée en présence de dextrans et d'acétate de sodium avec 16 mm contre UR au 8^{ème} jour (Figure 28c) ou bien 15 mm en présence du pyruvate contre SA et BS au 8^{ème} et 10^{ème} jour (phase stationnaire) (Figure 28a, b). La croissance dans les cinq milieux de culture (Figure 28d) est à l'image des niveaux d'activité, pas très importante, le minimum de biomasse est noté dans les milieux additionnés de succinate et de propionate, alors que le maximum de biomasse est enregistré avec l'acétate de sodium à 4,85 g/L. Pour le reste des autres sources la quantité de biomasse est < 3 g/L. L'évolution du pH dans les cinq milieux était différente (Figure 28d). Alors que dans les deux milieux qui ont le moins bien marché (propionate et succinate) le pH avait tendance à s'acidifier. En présence des trois autres sources (dextrans, pyruvate et acétate de sodium) le pH neutre initialement avec une moyenne de 7,25 augmentait ne dépassant pas 8,5 en fin de cinétique.



Suite de la Figure 28. Cinétiques de croissance et de pH de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-CSL en présence de dextrans ou de succinate ou d'acétate de sodium ou de pyruvate ou de propionate.

➤ **Choix de la meilleure source de carbone**

Comme avec les sources d'azote, les activités maximales obtenues avec les sources de carbone ont été regroupées et présentées par souche-cible sous forme d'histogrammes dans la Figure 29. La Figure 29a représente les meilleures activités antifongiques observées contre UR. Cette Figure montre que le milieu supplémenté de saccharose est celui qui a induit la meilleure inhibition

(32 mm). Il est suivi de près par le fructose et le glucose et loin derrière par les dextrines, l'acétate de sodium, le pyruvate et le succinate.

La Figure 29b, résume les activités maximales résultants de l'activité antibactérienne exprimée contre SA et BS. Elle confirme aussi que le saccharose est la meilleure source de carbone pour la production de l'activité antibactérienne contre les bactéries *Staphylococcus aureus* (28 mm) et *Bacillus subtilis* (22 mm). Il est suivi par le fructose puis le glucose.

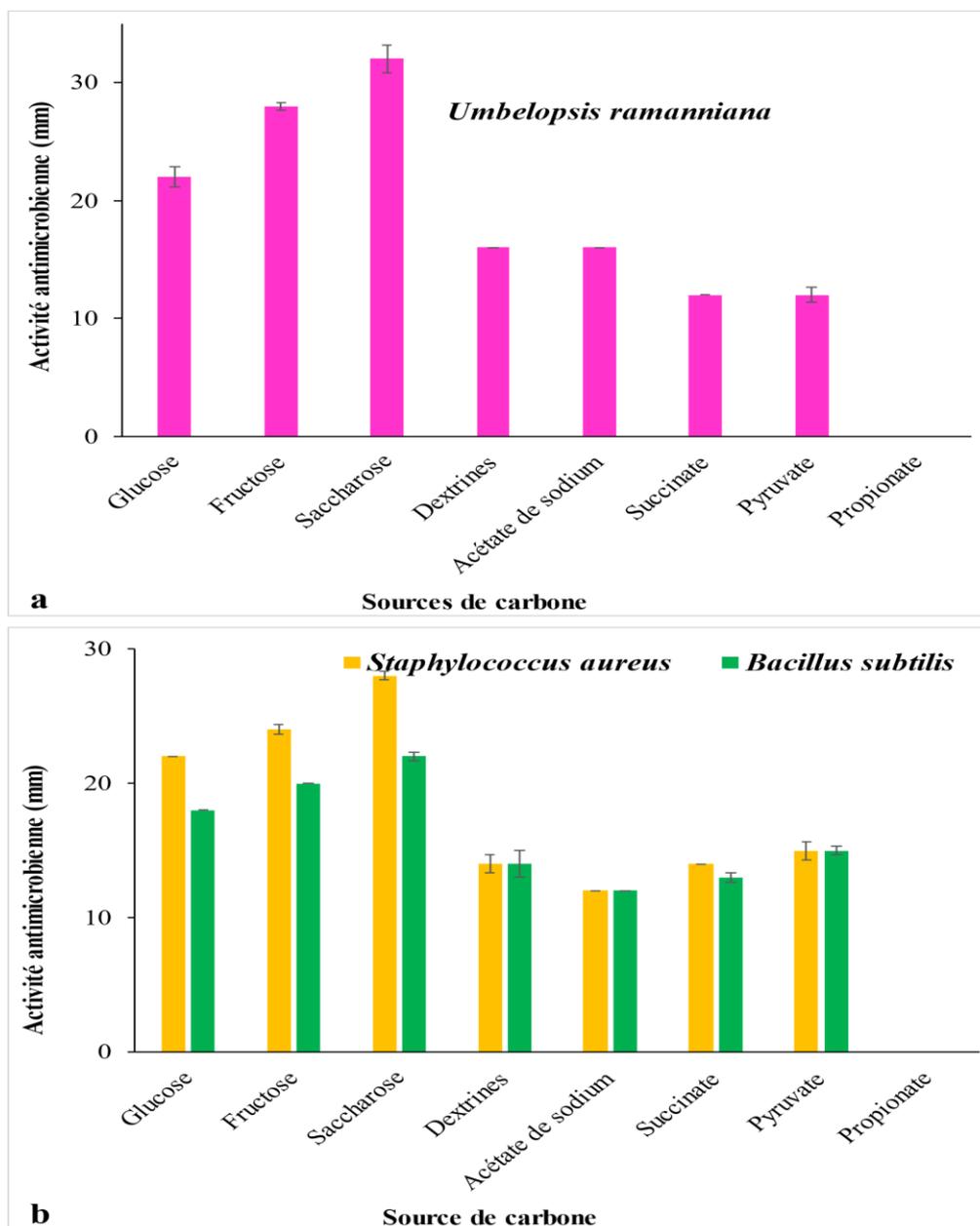


Figure 29. Activité antimicrobienne au jour de production optimale de la souche *Sx. tamanrassetensis* cultivée dans le MB-CSL additionné de différentes sources de carbone.

Des huit sources de carbone testées (glucose, dextrines, fructose, saccharose, propionate, pyruvate, succinate et acétate de sodium.), le saccharose est le nutriment carboné qui a donné les meilleures activités.

3. Discussion

L'étude de la production de molécules biologiquement actives chez une souche commence toujours par la sélection d'un milieu de production optimale. Notre but étant de produire les molécules antimicrobiennes de la souche SA198 de *Sx. tamanrassetensis*, sur un milieu différent du milieu complexe ISP2, le choix s'est porté sur le milieu de base synthétique élaboré par [Strub \(2008\)](#) et que nous avons quelque peu modifié. Ce milieu économiquement intéressant a déjà été utilisé par d'autres chercheurs pour la production de molécules bioactives intéressantes et même originales ([Zitouni et al., 2005](#); [Bakour, 2006](#); [Bouras et al., 2006a, b, 2007](#); [Bouras et al., 2008](#); [Strub, 2008](#); [Strub et al., 2010](#); [Laassami, 2015](#); [Tata, 2020](#)). La sélection de la meilleure source d'azote et de carbone à ajouter au milieu pour la production de l'activité antimicrobienne a été analysée par la méthode d'optimisation classique « un facteur à la fois ».

Lorsque la capacité d'une souche d'actinobactérie à produire des antibiotiques est reconnue, cette capacité n'est pas pour autant fixe mais peut être considérablement augmentée ou au contraire complètement perdue suivant les conditions de nutrition et de culture dans laquelle elle se trouve ([Singh et al., 2017](#); [Zhou et al., 2017](#)). Il existe une relation certaine entre la composition du milieu de culture et le métabolisme secondaire ([Elibol, 2004](#); [Azma et al., 2011](#); [Singh et al., 2017](#)).

L'addition de différentes sources d'azote et de carbone dans le milieu MB a provoqué une fluctuation de la production de l'activité antimicrobienne, ceci était aussi le cas pour la croissance de la souche SA198 de *Saccharothrix*. Des chercheurs se sont déjà consacrés à l'étude de l'influence de la source d'azote et de carbone sur la production d'antibiotiques dans le milieu de culture chez diverses souches de *Saccharothrix* ([Zitouni, 2005](#); [Bouras et al., 2006a, 2006; 2007, 2008](#); [Strub, 2008](#); [Wang et al., 2011](#); [Laassami 2015](#)). Toutes ces études confirment le rôle important de la nutrition dans l'apparition et l'intensité même du métabolisme secondaire, de même qu'elles affirment que l'épuisement de certains éléments essentiels ou encore la diminution du taux de croissance peuvent initier la synthèse des biomolécules.

Nos résultats de l'évolution dans le temps des cinétiques de production antimicrobiennes révèlent certains points communs dans les différents milieux de culture, comme l'absence d'une phase de latence et une phase stationnaire de courte durée. L'absence de la phase de latence déjà signalée à de nombreuses reprises dans d'autres travaux a été expliquée par le fait que les pré-

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

cultures préparées pour inoculer les cultures de production, étaient prises en phase exponentielle de croissance (Zitouni, 2004; Badji, 2006; Boudjella, 2007; Toumatia, 2010; Boulkour., 2016; Belghit, 2016; Hamza *et al.*, 2018).

Les maximas d'activités antimicrobiennes obtenues ont été pour la majorité produits en fin de phase stationnaire de croissance, à l'instar d'autres métabolites secondaires, les antibiotiques sont souvent produits après la phase de croissance des microorganismes et durant leur phase stationnaire ou du fait de l'épuisement de la source de carbone ou d'azote (Rafieenia, 2013). Toutefois plusieurs auteurs ont constaté que dans le cas des actinobactéries cette production peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire ou de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Aouiche, 2013; Lahoum *et al.*, 2019; Tata, 2020).

D'une manière globale, le taux de croissance cellulaire était relativement élevé les six premiers jours de même qu'il était lié à l'apparition de la production antimicrobienne. En effet, cette production débutait fortement durant la phase exponentielle et progressait jusqu'à atteindre un maxima durant les phases de ralentissement et stationnaire. Lorsque la phase de croissance entamait sa phase de déclin, la production antimicrobienne diminuait aussi. Cela confirme le fait que le processus de biosynthèse des métabolites secondaires des actinobactéries est lié à leur cycle de vie et donc à leur croissance (Van der Heul *et al.*, 2018).

L'évolution du pH au cours des cinétiques en présence des meilleurs milieux de production d'activités antimicrobiennes (CSL, peptone, extrait de levure, glucose, fructose, saccharose) présentait une variation assez légère (une tendance progressive vers une basification du pH) entre 7,2 et 8,5. Ceci suggère que les activités antimicrobiennes étaient produites plus aux alentours des pH basiques. En effet, la dégradation des sources azotées organiques tels que les acides aminés présents dans le CSL, la peptone ou l'extrait de levure induit la basification du milieu après libération et accumulation de l'ammoniac, et ce, suite à une désamination de ces acides aminés. De telles constatations sont en accord avec de nombreux travaux réalisés sur l'optimisation de la production d'antibiotiques où les pH induisant les activités maximales correspondent à des pH basiques (Hata *et al.*, 1971; Larpent et Sanglier, 1989; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992; Boudjella, 2007; Strub, 2008; Jain *et al.*, 2011; Merrouche, 2012; Boubetra *et al.*, 2013b; Boulkour, 2016; Hamza *et al.*, 2018).

Plusieurs études ont prouvé le lien étroit entre la synthèse antibiotique de nombre microorganismes entre autres les actinobactéries et la nature et la concentration de la source d'azote dans le milieu de culture (Aharonowitz, 1980; Rafieenia, 2013). Les résultats des cinétiques en fonction des différentes sources d'azote testées montrent une variabilité de résultats quant à l'apparition de l'activité antimicrobienne mais aussi pour la croissance de la souche SA198. Sur les

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

seize sources d'azote testées, certaines ont été concluantes (CSL, peptone, leucine, extrait de levure et valine), d'autres l'ont été moyennement (extrait de malt, caséine, arginine, tryptone, tyrosine, alanine et sulfate d'ammonium) et d'autres ne l'ont pas été (L-proline, cystine, méthionine et lysine).

Les faibles résultats obtenus avec certaines sources d'azote telles que la proline, la cystine, la méthionine, l'arginine, la tyrosine, l'alanine, le sulfate d'ammonium et la lysine pourraient être dus au fait qu'elles soient rapidement métabolisables. En effet il est établi que dans ce cas, ces sources induisent généralement une réduction de la production d'antibiotiques chez différents microorganismes de même que chez les actinobactéries (Patvine et Peringer, 1994). Nos constatations en présence de sources d'azote complexes rejoignent celles des chercheurs ayant démontré que des sources telles que la farine de soja, le CSL, la peptone, l'extrait de malt, la caséine, la tryptone, et l'extrait de levure pouvaient augmenter la production d'antibiotiques produits par des microorganismes type actinobactéries, et qui a été attribué à la décomposition lente de ces composés dans le milieu (Gao *et al.*, 2009; El-Enshasy *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2011).

Par ailleurs, un milieu contenant des sels d'ammonium comme seules sources d'azote ne convient pas à la production d'antibiotiques et l'utilisation de sources d'azote inorganiques telle que le sulfate d'ammonium dans notre cas peut conduire à des concentrations élevées d'ammonium dans le milieu de culture, et supprimerait la production d'antibiotiques. Il est d'ailleurs recommandé dans les industries de production d'antibiotiques de compléter cet apport par des concentrations élevées de sources d'azote complexes (Rafieenia, 2013).

Le processus de production de l'activité antibactérienne et antifongique dans les milieux additionnés de CSL, de peptone, de leucine, d'extrait de levure ou de valine, montre que les activités apparaissent en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance alors que les inhibitions maximales se manifestaient en fin de phase stationnaires (CSL et peptone) voire en phase de déclin (extrait de levure, valine et leucine). Ces activités paraissent découplées à la croissance et interviendraient tardivement. Cela démontre l'implication directe de la source d'azote avec ces deux fonctions (métabolisme secondaire/croissance) par rapport à d'autres sources du milieu, tels que les macro ou micro-nutriments. C'est particulièrement le cas si la source d'azote est complexe et à base d'acides aminés comme avec le CSL, la peptone ou l'extrait de levure, où les acides aminés peuvent jouer des rôles structurels dans le cas des NRPS et PKS ou lorsque des groupements aminés ou amides font partie de la structure des métabolites secondaires (Romano *et al.*, 2018). Nos observations ont été déjà constatées chez *Sx. algeriensis* (Bouras, 2005; Strub, 2008; Merrouche, 2012). Enfin selon Romano *et al.* (2018) il y a un paramètre à considérer qui est l'équilibre entre la prolifération cellulaire et le métabolisme secondaire qui se produit pendant la phase de croissance stationnaire et qui influence donc le métabolisme secondaire.

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Le CSL a été la meilleure source d'azote, en produisant les activités les plus importantes et contre les trois germes testés dans l'étude. Le CSL est une matière première peu coûteuse mais importante, sous-produit des industries de l'amidon de maïs (Yang *et al.*, 2013). Il a une valeur nutritionnelle élevée, et constitue une excellente source d'azote et de carbone largement utilisée dans des processus biopharmaceutiques en supplément dans des milieux de production avec microorganismes. Il est riche en protéines, acides aminés, minéraux, vitamines et microéléments (Pereira *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2013; Hofer *et al.*, 2018). Nos observations avec le CSL corroborent celles faites par Laassami (2015) et effectuées sur la même souche. Plusieurs autres chercheurs ont déjà signalé le CSL en tant que meilleure source d'azote pour la production de métabolites chez certains microorganismes, c'est le cas de la production de métabolites primaires comme l'acide lactique par des souches de *Lactobacillus* (Lee, 2005; Yu *et al.*, 2008), la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* (Pereira *et al.*, 2010), la production d'acide succinique par *Actinobacillus succinogenes* NJ113 (Xi *et al.*, 2013) et la production de caroténoïdes par *Sporidiobolus pararoseus* (Valdugan *et al.*, 2013). En ce qui concerne la production de métabolites secondaires, Sarada et Sridhar (1998) ont constaté que parmi diverses sources d'azote testées, le CSL donnait une production maximale de céphamycine C par *Streptomyces clavuligerus*. Le remplacement de l'extrait de levure (coûteux) par du CSL par De Azeredo *et al.* (2006), avait permis de stimuler la production de protéases par *Streptomyces* sp. 594. La production de pullulane par *Aureobasidium pullulans* RBF 4A3 a également été améliorée en utilisant le CSL comme source d'azote par rapport à d'autres déchets agro-industriels (Sharma *et al.*, 2013). La production de pénicilline par *Penicillium chrysogenum* a été augmentée en remplaçant le conventionnel milieu de fermentation au lactose par un milieu à base de CSL (Amadi et Ngerebara, 2017). Nos résultats avec le CSL sont intéressants dans la mesure où ce produit représente une très bonne alternative (peu onéreux) par rapport à l'utilisation coûteuse du très sollicité extrait de levure notamment au sein de notre laboratoire (LBSM) en tant que constituant du milieu de production ISP2 (Lamari *et al.*, 2002a; Zitouni *et al.*, 2004; Boudjella *et al.*, 2010; Boubetra *et al.*, 2013b; Khebizi *et al.*, 2017; Hamza *et al.*, 2018; Tata *et al.*, 2018; Lahoum *et al.*, 2019).

Les autres sources d'azote ayant donné de bons résultats sont la peptone, la leucine, l'extrait de levure et la valine. Les résultats obtenus avec la peptone sont les plus proches de ceux avec le CSL. Les peptones sont des sources d'azote organiques complexes et sont des protéines hydrolysées (Atlas, 2005). La peptone a déjà été citée comme une bonne source d'azote dans des travaux (Cho *et al.*, 2012; Ababutain *et al.*, 2013; Gunda et Charya. 2013; Al-Ghazali et Omran, 2017). Alors que, Pandey *et al.* (2005) avait constaté chez *Streptomyces kanamyceticus* M27, que la peptone ne favorisait pas la production de kanamycine. L'addition de l'extrait de levure ou de la valine dans le

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

milieu, n'avait pas permis de produire une activité contre BS, par contre une bonne activité contre le staphylocoque et le champignon est observée. L'extrait de levure, de par sa composition, constitue une source d'azote riche et diversifiée, il est très utilisé pour la production des antibiotiques, y compris pour les *Saccharothrix* comme évoqué plus haut. En présence de la caséine et de la tryptone, la production de l'activité antimicrobienne par la souche SA198 a été faible. Ces résultats sont similaires à ceux de Belkacem (2012). Le troisième groupe de source d'azote utilisé et constitué par le L-tryptophane et le sulfate d'ammonium. Il a été constaté que l'activité antibactérienne en présence des sources d'azote du premier groupe est nettement meilleure que celle observée pour le deuxième groupe. En revanche, aucune activité antimicrobienne n'est obtenue avec les sources d'azote du troisième groupe. En présence d'extrait de malt dans le milieu, aucune activité antimicrobienne n'est détectée. Ceci rejoint quelques travaux rapportés dans la littérature où l'extrait de malt défavorise la production d'antibiotiques par certaines souches de *Streptomyces* spp (Omura, et Tanaka 1986; Escalante *et al.*, 1999). Dans cette expérience, le CSL s'est avéré être la meilleure source d'azote il a été additionné dans le milieu MB pour déterminer la meilleure source de carbone.

Les résultats de la recherche de la meilleure source de carbone, ont montré que le saccharose était le sucre le plus performant suivi du fructose et du glucose. Comparé à la fermentation avec le glucose, le fructose a induit une meilleure activité antifongique alors que le saccharose a stimulé les deux activités antifongique et antibactérienne. Le saccharose est un disaccharide composé de deux hexoses (glucose et fructose) qui doit être hydrolysé avant son utilisation dans la biosynthèse. Plusieurs travaux font apparaître ce sucre comme une source idéalement préférée par certains microorganismes. C'était le cas pour la production d'un agent anticarcinogène de nature polysaccharidique par *Cordyceps sinensis* et possédant une forte activité antioxydante, pour qui le saccharose comme source de carbone a été préféré à la mélasse qui avait pourtant donné de meilleurs résultats, mais parce que ce sucre est bon marché et bien adapté à la production à grande échelle, il a été choisi pour la suite de l'optimisation du procédé de production (Hsieh *et al.*, 2005). Notre résultat concorde aussi avec celui obtenu par Islam *et al.* (2009), Ramos et Said (2011) ou encore avec l'étude de Xu *et al.* (2017) pour la production de l'activité antioxydante d'un exopolysaccharide (EPS) produit par *Phellinus vaninii* Ljup qui a conclu pour le mélange glucose et saccharose pour favoriser la croissance, alors que le rendement maximum d'EPS était atteint avec le saccharose seul. Enfin, dans une recherche sur la sécrétion de molécules antibactériennes par *Bacillus amyloliquefaciens*-9, le saccharose a été la meilleure source de carbone pour la croissance et le métabolisme (Zhang *et al.*, 2020). Toutefois il existe d'autres travaux rapportant de plus faibles productions des activités antimicrobiennes en présence du saccharose (Al-Baarri *et al.*, 2011; Arasu *et al.*, 2014; Ababutain *et al.*, 2013).

Par ailleurs, il est établi qu'il peut y avoir des différences dans les préférences métaboliques entre différentes espèces appartenant à un même genre (Molina-Ramírez *et al.*, 2017). Mais pas que, une même souche peut avoir des préférences nutritionnelles pour pouvoir produire des métabolites spécifiques. Par exemple, Zitouni (2005) avait constaté que chez la souche *Saccharothrix* SA 103, la production des mutactimycines étaient favorisées par le fructose et le glucose alors que la synthèse des macrolides et d'autres antibiotiques nucléosidiques l'était par la présence de glucose et de saccharose. Un autre exemple constaté chez, *Komagataeibacter xylinus* et testé pour sa production de cellulose sur différentes sources de carbone, montrait que le saccharose, le glucose, le fructose ou le mannitol étaient utilisés (Molina-Ramírez *et al.*, 2017) ; alors que dans une autre étude menée par El-Saied *et al.* (2004), le fructose produisait un faible rendement au détriment du glucose considéré comme la principale source de carbone pour la production par rapport aux trois autres sucres.

En étudiant la littérature, sur l'effet de différentes sources de carbone sur la production de divers métabolites, plusieurs résultats ont indiqué que les sucres simples affectaient souvent la production d'antimicrobiens pour les espèces d'actinobactéries (Nishanth *et al.*, 2013). Pour exemple, le glucose pour les espèces de *Saccharorhrix* (Zitouni, 2005) ou de *Streptomyces* (Rizk et Metwally, 2007; Rafieenia, 2013), le saccharose pour un nouveau streptomycète (Charkrabarti et Chandra, 1982), le fructose pour *Streptomyces thermoviolaceus* (James et Edwards, 1988), l'amidon (Zitouni, 2005; Tata, 2020) etc., ont été signalés comme convenant à la production de métabolites secondaires.

Il ressort de cette étude que la synthèse des molécules bioactives de la souche SA198 est fortement liée à la nature de la source de carbone et d'azote du milieu de culture. Le milieu MB additionné de CSL et de saccharose est retenu pour les études d'optimisation statistique.

4. Cinétique de production dans le milieu ISP2

Une cinétique sur le milieu ISP2 est menée dans les mêmes conditions que lors des cultures de recherche de la meilleure source de carbone et d'azote. Le milieu ISP2 pour « International *Streptomyces* Project » est un milieu complexe, à base d'extrait de malt, d'extrait de levure et de glucose. Pour rappel, les travaux menés sur la même souche par Boubetra (2013) ont été effectués exclusivement sur le milieu ISP2. Le but ici est de confronter nos résultats du milieu ISP2 avec ceux de Boubetra (2013). Aussi, les résultats obtenus dans le milieu ISP2 sont comparés à ceux du milieu MS-CSL-saccharose (meilleur milieu de production).

4.1. Résultats

La [Figure 30](#), regroupe les résultats du suivi de l'activité antimicrobienne (contre SA, BS et UR) de la biomasse et du pH dans le milieu ISP2.

Durant cette cinétique, l'activité antimicrobienne se manifeste dès le 1^{er} jour contre UR mais le 2^{ème} jour contre SA et BS (phase exponentielle). L'activité est assez marquée contre SA et UR où elle atteint des maxima de 36 et 32 mm respectivement au 8^{ème} jour de cinétique (début de la phase stationnaire) et relativement moyenne contre BS, avec un maximum noté au 7^{ème} jour de 22 mm. Le taux de croissance maximal atteint 9,2 g/L en fin de cinétique. Le pH du milieu de culture a peu évolué, et est demeuré proche de la neutralité, d'un pH initial de 7,25 à un pH légèrement basique de 8,14 en fin de culture.

La cinétique de croissance sur ce milieu se caractérise par le phénomène de diauxie. En effet, après les 3 premiers jours de forte croissance, se produit un ralentissement qui a duré 3 jours où le taux de croissance est relativement stable, puis une reprise de la croissance jusqu'au 9^{ème} jour où on peut observer les prémices d'une phase stationnaire très courte puis une phase de déclin (données non présentées).

Il est à signaler que la culture dans le milieu ISP2 est de couleur brune en début de cinétique. Cette couleur vire progressivement au cours du temps au brun jaunâtre foncé, et est étroitement corrélée à la sécrétion des produits actifs. En effet, l'activité est d'autant plus importante que la couleur devient plus foncée, ce qui coïncide avec le maximum de production.

Durant cette étape d'étude et de réalisation de cinétiques dans le milieu liquide ISP2, des variations relativement importantes ont été observées particulièrement en ce qui concerne la production des antibiotiques. En effet, nous avons rencontré des problèmes de non reproductibilité des résultats. Pour le même milieu de culture (ISP2) et dans des conditions de culture identiques, nous avons observé des écarts importants entre les trois essais (répétitions). Ceci se traduisait par des couleurs différentes (brune, rouge et beige) du filtrat de culture. Dans la fiole d'Erlenmeyer où apparaissait la couleur brune, la production d'antibiotiques avait lieu normalement. Par contre, dans les fioles où la couleur était rouge ou beige, aucune production n'était détectée. De ce fait, les expériences ont été refaites plusieurs fois jusqu'à obtention de la couleur désirée du milieu de

culture. Ces résultats hétérogènes demeurent difficiles à expliquer surtout que les cultures ont été effectuées dans des conditions identiques et l'inoculum utilisé provenait du même stock.

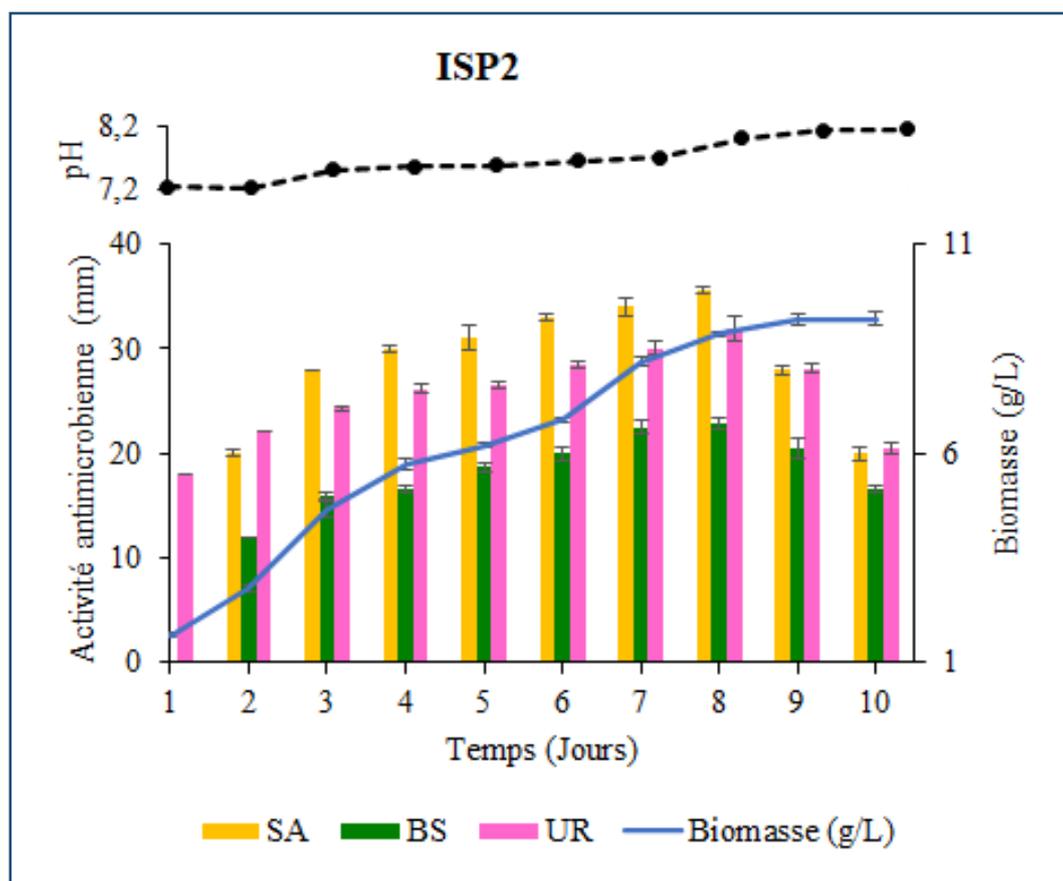


Figure 30. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes, de croissance et de pH de la souche *Saccharothrix tamanrassetensis* cultivée dans le milieu ISP2.

4.2. Discussion

Les résultats obtenus dans le milieu ISP2 sont confrontés à ceux obtenus par Boubetra (2013). Il est constaté que comme dans le travail de référence, la production des activités antibactériennes et antifongiques est en corrélation avec la croissance de la souche. Le jour de production optimale est à un jour près le même. Si dans le cas de l'activité antimicrobienne contre UR il est le même à savoir le 8^{ème} jour à un pH légèrement basique, contre BS il atteint son maximum le 7^{ème} jour et se maintient le 8^{ème} jour. Si l'activité contre SA résistante à la méthicilline n'avait pas été constatée lors des travaux de Boubetra (2013), nos résultats mettent en évidence une activité très intéressante et assez importante (32 mm) et optimale au 8^{ème} jour dans le milieu ISP2.

Le phénomène de diauxie observé à partir de la courbe de croissance était aussi signalé dans le travail de référence de Boubetra (2013). Chez les bactéries, ce phénomène se caractérise par une

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

répression catabolique et une courbe de croissance biphasique. Appelé aussi « effet glucose », il est l'un des mécanismes les plus conservés chez les microorganismes (Galinier, 2018). Mis en évidence par Jacques Monod en 1942, il fut décrit en 1974 par Lee *et al.* en arguant d'un temps d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de culture. En effet, dans le milieu de culture les bactéries préféreront en premier l'hydrate de carbone le plus rapidement métabolisable, généralement le glucose, mais pas toujours (van der Stel *et al.*, 2018), par rapport à une autre source de carbone présente aussi dans le milieu. Cette croissance en diauxie peut aussi se jouer entre une seule source osidique et une source azotée telle que cela a été décrit chez *Saccharothrix algeriensis* (Bouras *et al.*, 2015b). Par ailleurs, les acides aminés (en particulier ceux chargés négativement et ceux de faibles poids moléculaire) sont dans un premier temps préférés et utilisés par l'actinobactérie pour sa croissance. Ces acides aminés sont utilisés au cours de la première phase exponentielle alors que le glucose, le sera majoritairement au cours de la deuxième phase exponentielle. Le même résultat obtenu par Boubetra (2013) dans le milieu ISP2 avec *Saccharothrix tamanrassetensis*, confirme le mode de croissance en diauxie chez cette souche d'actinobactérie.

Le milieu ISP2, connu pour sa richesse en nutriments, s'est montré favorable pour la production des activités antimicrobiennes par la souche *Sx. tamanrassetensis*. Ce milieu est largement utilisé pour ce genre d'étude dans notre laboratoire (Lamari *et al.*, 2002a; Zitouni *et al.*, 2005; Boudjella *et al.*, 2006; Toumatia, 2010; Aouiche *et al.*, 2015; Belghit *et al.*, 2016; Driche *et al.*, 2017; Lahoum *et al.*, 2019).

Durant nos cinétiques en milieu liquide le problème de variabilité des résultats était récurrent dans le cas de la souche *Sx. tamanrassetensis* SA 198. Cette difficulté n'est pas un fait inédit ou un cas isolé. En effet, dans le cadre de recherches sur la formation d'antibiotiques sur des souches d'actinobactéries sauvages (en majorité sur le genre *Streptomyces* mais pas que), les entraves dues à la variabilité notoire des taux de production sont fréquemment discutées et ce même entre des lots de cultures parallèles de la même souche sur fioles d'Erlenmeyer (Minas *et al.*, 2000). Aussi nombre de chercheurs ont signalé des cas similaires (Benslimane, 1996; Drouin, 1996; Saffroy, 2006; Siebenberg *et al.*, 2010) ou se sont consacrés à étudier la manière de réduire la variabilité des résultats lors d'un processus de fermentation (Zhang et Greasham., 1999; Büchs, 2001; Neves *et al.*, 2001; Siebenberg *et al.*, 2010; Keil *et al.*, 2019; Schrader *et al.*, 2019). Certaines de ces études préconisent la recherche des conditions garantissant la reproductibilité de la croissance et de la production avant de continuer les études de cinétiques. Alors que toutes s'accordent sur des recommandations, mettant en cause les conditions d'ensemencement des précultures et des cultures, l'âge de l'inoculum au moment de l'ensemencement des cultures de production ou encore

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

l'ammonium produit, mais aussi le procédé de fermentation et enfin la formulation de milieu de production chimiquement défini.

- Le contrôle rigoureux des conditions de culture (quantité d'inoculum, état physiologique de la préculture, volume utile des cultures, biomasse produite, aération, pH) est certes déterminant pour la reproductibilité des résultats.

- L'effet ammonium : L'effet ammonium sur la production des antibiotiques a été cité par plusieurs auteurs. On peut citer [Lebrihi et al. \(1992\)](#) et [Untrau et al. \(1994\)](#) pour la production de la spiramycine ou encore [Jonsbu et al. \(2001\)](#) pour celle de la nystatine. Ces auteurs ont montré que les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production de l'antibiotique.

- Le procédé de fermentation : la fermentation en fioles d'Erlenmeyer peut entraîner des limitations au niveau des transferts de matière et particulièrement d'oxygène suite à l'augmentation de la viscosité du milieu et à la forte densité microbienne, rendant difficile le contrôle des conditions de culture. L'un des problèmes pourrait être dû à une limitation en oxygène au cours de la culture. L'ajustement à la demande, en oxygène dans le système « fiole d'Erlenmeyer /agitateur » peut certes être obtenu par diminution du volume utile et de la concentration en biomasse, mais il est cependant impossible de contrôler l'apport d'oxygène en cours de culture. Toutefois, la difficulté d'obtention de cultures reproductibles en fioles d'Erlenmeyer ne doit pas remettre en cause l'utilisation de ce procédé. Pour des études d'optimisation et de régulation plus approfondies, le fermenteur est utilisé pour maîtriser tous les paramètres de la culture (aération, agitation, pH...).

L'utilisation de milieux de culture chimiquement définis ou de composition déterminée peut s'avérer d'une grande aide voire même recommandée pour certains procédés de fermentations commerciales. Les entreprises qui ont opté pour ce type de procédés industriels mettent en avant des caractéristiques très favorables à grande échelle et qui ne sont pas observées avec les milieux complexes traditionnels.

5. Comparaison entre les milieux ISP2 et MB-CSL-saccharose

Le milieu de base additionné de CSL et de saccharose est sélectionné pour la production des molécules bioactives de la souche *Sx. tamanrassetensis*. Toutefois, une comparaison entre les résultats des cinétiques sur MB-CSL-saccharose et ISP2 est réalisée afin de voir lequel a été le plus favorable à la production des activités antimicrobiennes par la souche SA198.

5.1. Résultats

L'activité antimicrobienne produite dans les deux milieux MB-CSL-saccharose et ISP2 et évaluée contre les trois germes tests SA, BS et UR est illustrée par les [Figures 31a, b et c](#)

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

respectivement. Bien que dans les deux milieux testés, les deux activités antibactériennes et antifongiques sont détectées, les Figures montrent clairement que la production d'activité était un peu plus importante dans le milieu complexe ISP2. Aussi quelques similitudes et différences sont à signaler, en effet, les activités se manifestent dès la phase exponentielle de croissance (Figure 31d), néanmoins, l'activité antibactérienne (contre SA et BS) est absente au premier jour de cinétique dans les deux milieux comparés. Quant à l'activité antifongique, elle est présente et même importante dès le premier jour dans l'ISP2 mais absente dans le MB-CSL-saccharose. Après la phase exponentielle, les activités antimicrobiennes continuent progressivement à augmenter durant les phases de ralentissement et stationnaire (Figure 31d).

La production de l'activité antibactérienne contre (SA) est nettement meilleure sur l'ISP2 (Figure 31a), un peu meilleure contre (BS) dans l'ISP2 (Figure 31b). Pour l'activité antifongique, la production est presque similaire sauf lors des premiers jours de la cinétique où elle est plus importante dans l'ISP2 (Figure 31c).

Que ce soit dans le MB-CSL-saccharose ou en milieu ISP2, la production de l'activité antimicrobienne est couplée avec la croissance. Elle débute fortement durant la phase exponentielle et continue progressivement à augmenter durant les phases de ralentissement et stationnaire.

La croissance de *Sx. tamanrassetensis* dans les deux milieux ISP2 et MB-CSL-saccharose (Figure 31d) montre l'absence d'une phase de latence, bien qu'elle ait connu une croissance diauxique en milieu ISP2. La biomasse est plus élevée dans le milieu MB-CSL-saccharose par rapport au milieu ISP2. Le pH du milieu ISP2 montre de légères variations, par contre le pH du milieu MB-CSL-saccharose évolue pendant la fermentation pour devenir basique (Figure 31e).

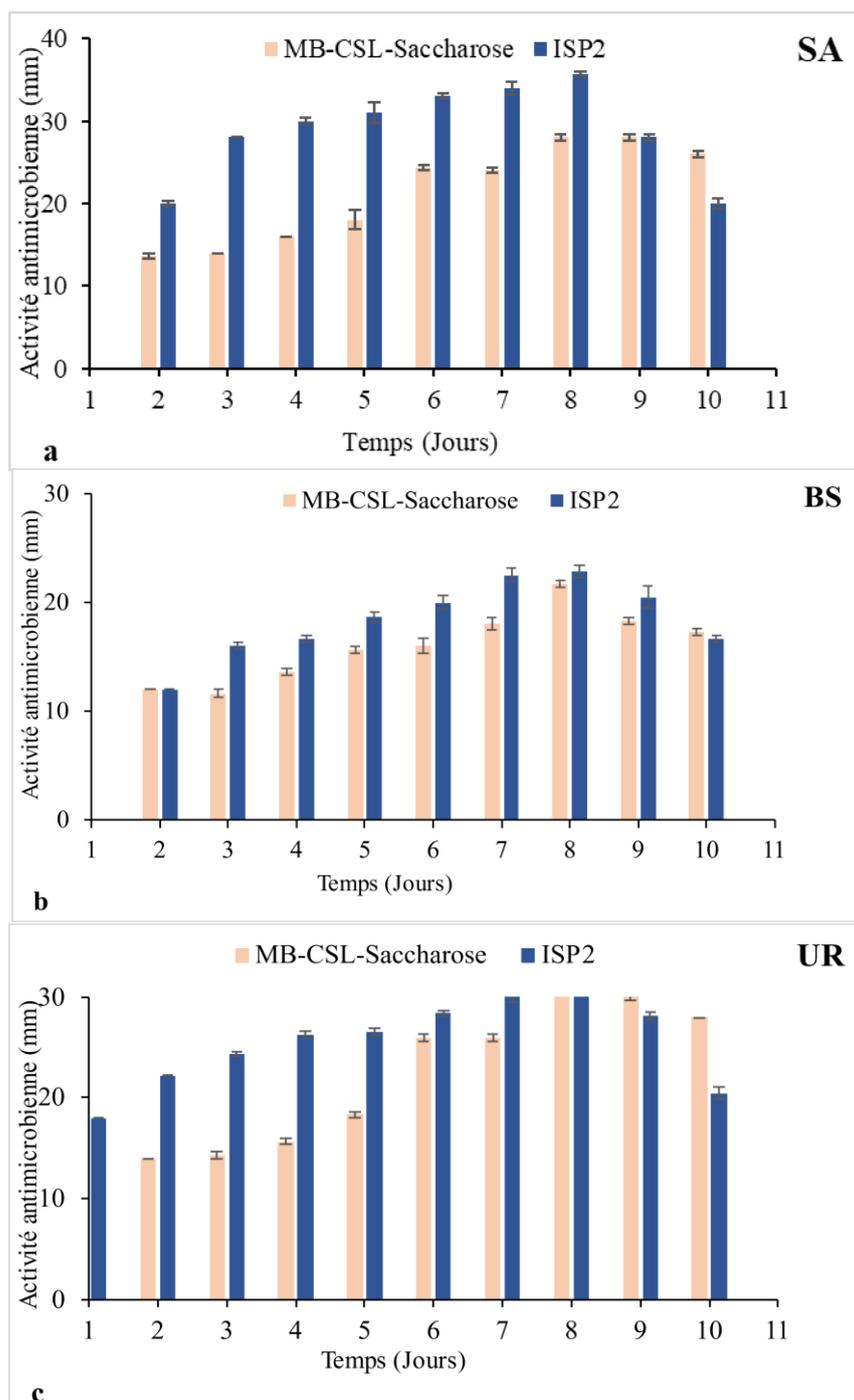
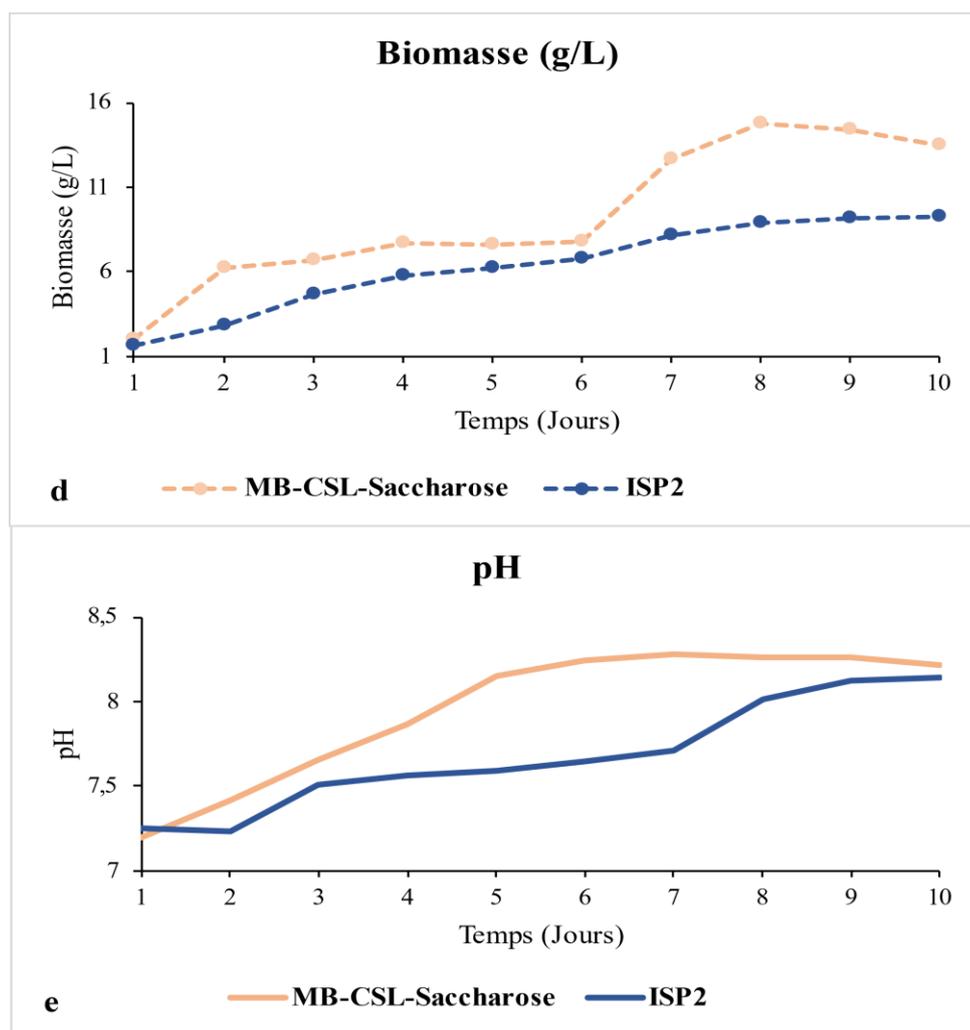


Figure 31. Cinétique de l'activité antimicrobienne de la souche *Sx. tamanrassetensis* contre SA (a), BS (b) et UR (c) dans les milieux MB-CSL-saccharose et ISP2.



Suite de la Figure 31. Cinétiques de l'évolution de la biomasse (d) et du pH (e) de la souche *Sx. tamanrassetensis* dans les milieux MB-CSL-saccharose et ISP2.

5.2. Discussion

Chez les actinobactéries, le cycle de développement est typiquement relié à la production de composés bioactifs, ces derniers, vraisemblablement produits pour garantir l'apport en nutriments pendant l'évolution de la croissance (Van der Heul *et al.*, 2018). Aussi, cette production peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire ou même de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Hamza *et al.*, 2018; Merrouche *et al.*, 2019; Lahoum, 2017; Tata, 2020). Dans le cas de la souche SA198, la production est globalement associée à la croissance.

La souche *Sx. tamanrassetensis* SA198, produit dans les deux milieux de culture ISP2 et MB-CSL-saccharose des molécules bioactives avec des propriétés antibactériennes et antifongiques. Toutefois dans le milieu complexe ISP2, la production est légèrement plus importante que dans le MB-CSL-saccharose.

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Au sein du LBSM, le milieu complexe ISP2 est l'un des milieux les plus sollicités pour la culture des actinobactéries et la production de biomolécules. D'ailleurs il a déjà été soit distingué comme meilleur milieu de production (Badji, 2006; Boudjella, 2007), soit utilisé pour la production des métabolites bioactifs (Zitouni, 2004; Zitouni *et al.*, 2005; Badji *et al.*, 2009; Bouras *et al.*, 2013; Belghit *et al.*, 2016; Lahoum *et al.*, 2017). Dans le cas de *Sx. tamanrassetensis* SA198, Boubetra *et al.* (2013b) avait abouti à la caractérisation de trois molécules produites à partir d'une culture sur le milieu ISP2. Toutefois, ce milieu a un coût du fait des ingrédients qui le composent, et le remplacer par un milieu semi-synthétique voire défini tout en conservant ou en améliorant la qualité de la production est le but ultime de tout procédé fermentaire (Zhang et Greasham, 1999; Gutiérrez-Correa et Villena, 2010).

Le milieu MB-CSL-saccharose est un milieu semi-synthétique composé d'ingrédients minéraux et additionné de saccharose et de CSL. Ce dernier constituant tel que déjà cité plus haut (paragraphe 1.2.), outre le fait d'être une excellente source de protéines pour nombre de microorganismes et dans ce milieu en particulier, représente une bonne alternative de remplacement du milieu ISP2. Le CSL est un sous-produit liquide visqueux composé d'acides aminés, de minéraux, de vitamines et d'oligo-éléments et qui peut être utilisé comme une source d'azote riche et efficace afin de remplacer des milieux complexes coûteux à base d'extrait de levure, d'extrait de bœuf et de peptone dans les fermentations (Tan *et al.*, 2016; Taiwo *et al.*, 2018a).

Le CSL a été la meilleure source d'azote, un résultat qui corrèle avec les conclusions de Lee, (2005) et Yu *et al.* (2008). Le saccharose comme meilleure source de carbone rejoint les résultats obtenus par Islam *et al.* (2009) et Thakur *et al.* (2009). Plus récemment nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Amadi et Ngerebara, (2017) qui en remplaçant le lactose conventionnel par du saccharose dans un milieu à base de CSL a permis d'augmenter la production de pénicilline par *Penicillium chrysogenum*.

Lors du développement d'un procédé de fermentation, les matières premières composant le milieu de culture comptent et peuvent même représenter de 15 à 60% du coût de la production total (Kennedy et Krouse, 1999). On comprend alors l'importance d'avoir accès à des matières premières peu coûteuses. A cet égard, les résultats obtenus avec le milieu MB-CSL-saccharose sont intéressants du point de vue économique comparés à l'utilisation du milieu empirique ISP2. Au-delà de cet aspect, le recours à un milieu de production de formulation défini ou semi-défini et assurant une croissance cellulaire raisonnable comme c'était le cas avec le milieu MB-CSL-saccharose peut s'avérer très utile pour des études sur la régulation génétique, l'expression des protéines et les flux métaboliques (Zhang *et al.*, 2009). Le terme vague « semi-défini », fréquemment retrouvé dans la littérature, se réfère généralement à un milieu composé

principalement d'éléments nutritifs précis avec seulement un ou deux nutriments complexes (Zhang et Greasham, 1999).

En outre, l'emploi d'un milieu défini prévient l'incertitude due aux interactions entre composants complexes du milieu, et permet aussi d'éviter l'instabilité des résultats du fait de la facilité à reproduire l'environnement de culture originel (Zhang et Greasham, 1999; Huang et Tang, 2007). Ce dernier point a son importance dans ce travail au regard des difficultés de reproductibilité observées chez la souche SA198.

Plusieurs travaux rendent compte de l'efficacité du CSL en tant que source peu coûteuse de nutriments comme pour la production microbienne de céphamycine C par *Streptomyces clavuligerus* (Sarada et Sridhar, 1998), d'érythromycine par *Saccharopolyspora erythraea* (Zou et al., 2009) ; d'éthanol par *Clostridium ragsdalei* (Saxena et Tanner, 2011), de pullulane par *Aureobasidium pullulans* RBF 4A3 (Sharma et al., 2013) de Natamycine par *Streptomyces natalensis* (Lule et al., 2016) ou de protéase et de biopesticide par *Bacillus sphaericus* MBI5 (Kati et al., 2017). De même, de nombreux chercheurs ont visé comme objectif dans leurs travaux, de remplacer les produits chers tel que l'extrait levure ou la peptone par le CSL (Lawford et Rousseau, 1997; Kona et al., 2001; Lee et al., 2005; Tang et al., 2006; Maddipati et al., 2011; Xi et al., 2013; Liu et al., 2015; Tan et al., 2016; Taiwo et al., 2018b; Kaur et al., 2020).

A l'issue de cette partie du travail, le milieu MB-CSL-saccharose sera utilisé pour une optimisation statistique de la production de l'activité antimicrobienne.

III. OPTIMISATION STATISTIQUE DE LA PRODUCTION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Pour la suite de la recherche du milieu de production optimale de l'activité antimicrobienne par la souche SA198, nous avons envisagé un procédé plus pratique faisant appel aux plans d'expériences. Tout d'abord déterminer les paramètres de culture influençant la production de l'activité antimicrobienne via le plan Plackett-Burman, puis en appliquant la méthode des surfaces de réponses avec le plan Box Behnken, des équations polynomiales ont été générées et représentées sous la forme de tracés de surface bidimensionnels (2D) et montrant l'interaction des facteurs. Enfin, la validation des modèles proposés a été déterminée par la combinaison des différentes variables optimisées donnant la réponse maximale.

3.1. Résultats

3.1.1. Le plan Plackett-Burman pour le criblage des facteurs influençant l'activité antimicrobienne

Le plan d'optimisation de Plackett-Burman est utilisé afin de déterminer les facteurs (composants du milieu et autres paramètres) ayant une influence significative sur la production. Ainsi, l'importance de sept (07) paramètres physico-chimiques du milieu de culture sur la production de l'activité antifongique et antibactérienne par la souche SA198 de *Saccharothrix*, a été analysée par le plan Plackett-Burman. Ces paramètres sont : saccharose (X_1) ; K_2HPO_4 (X_2) ; $CaCl_2$ (X_3) ; $NaCl$ (X_4) ; corn steep liquor (X_5) ; temps d'incubation (X_6) et KH_2PO_4 (X_7). Nous rappelons que dans le chapitre « Matériel et méthodes », les valeurs extrêmes (concentrations et jours) sont choisies pour ces différents facteurs (voir [Tableau 7 p 55](#)). Ces facteurs ont été examinés en 12 combinaisons (essais) organisées selon la conception PB.

Le [Tableau 12](#) montre la moyenne de l'activité antimicrobienne (réponse) pour les différents essais enregistrés et correspond à la réponse (Y) représentant l'activité antimicrobienne estimée en millimètre à l'égard de trois germes cibles à savoir SARM ATCC 639c, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829.

Les réponses ont montré une variation nettement large de l'activité antimicrobienne de 0 à 20 mm. Cette variation traduit bien l'importance de l'optimisation du milieu pour atteindre une activité antibiotique plus élevée. L'activité maximale de 20 mm a été atteinte dans l'essai n° 11, tandis que l'activité la plus faible (zone d'inhibition ≤ 10 mm) a été enregistrée dans les essais n° 8 et 10. En revanche, aucune activité n'a été obtenue contre le champignon dans l'essai n° 1 et contre les trois micro-organismes cibles dans l'essai n° 4.

Tableau 12. Matrice du plan Plackett-Burman pour sept variables avec les réponses.

Essai n°	Niveaux des variables							Activité antimicrobienne Y (Distance d'inhibition en mm ± SEM) ^a		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	SARM ^b	BS ^c	UR ^d
1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	13 ± 1	15 ± 1	0
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	17 ± 1	18 ± 2	17 ± 1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	14 ± 0	11 ± 1	11 ± 1
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0
5	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	18 ± 1,15	16 ± 1	16 ± 0
6	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	15 ± 1	12 ± 0	10 ± 1
7	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	17 ± 1	17 ± 1	13 ± 1
8	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	10 ± 0	7 ± 3	9 ± 1
9	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	15 ± 0,67	14 ± 1	11 ± 1
10	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	11 ± 0,67	7 ± 3	8 ± 0
11	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	19 ± 0,67	20 ± 1	15 ± 1
12	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	16 ± 0	13 ± 1	11 ± 2

^a Moyenne de l'erreur type standard SEM des trois répétitions par essai ; ^b *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline 639c ; ^c *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) ; ^d *Umbelopsis ramanniana* (NRRL 1829).

La modélisation des résultats par le logiciel Minitab 17.0 et l'analyse statistique qui s'en est suivi ont permis de produire les graphiques illustrés par les Figures 32, 33 et 34 et le Tableau 13. L'interprétation des résultats se base sur l'observation des Figures identifiants les variables ayant un effet significatif positif sur la production antimicrobienne ainsi que sur l'analyse de la variance reprise dans le tableau.

En observant les Figures 32, 33 et 34, la dominance des trois variables individuelles (KH₂PO₄, CSL et saccharose) est évidente. Sur la base du niveau de confiance, la plus petite valeur de probabilité $p < 0,05$ (Elibol, 2004) confirme que le saccharose, le CSL et le KH₂PO₄ avaient des influences significatives sur l'activité antimicrobienne. Par ailleurs, selon les Figures 32 et 33 représentant l'effet des sept paramètres sur l'activité antibactérienne vis-à-vis du SARM et du BS, les composés qui se différencient du reste sont bien la concentration en KH₂PO₄, CSL et saccharose dans le milieu de culture. Comme le montre la représentation de la Charte de Pareto (Figure 32a ; 33a), les effets les plus importants sont attribués aux facteurs dont l'histogramme se trouve dans la partie supérieure, comme cela a été appliqué par de nombreux auteurs (Wang *et al.*, 2011; Arul Jose *et al.*, 2013). De la même façon les Figures 32b, c et 33b, c montrent que ce sont ces mêmes variables

(KH₂PO₄, CSL et saccharose) qui se démarquent du reste en présence des deux bactéries SARM et BS.

Dans le cas de l'expression de l'activité contre le champignon UR, en plus des trois variables (KH₂PO₄, CSL et saccharose) la variable CaCl₂ semble jouer aussi un rôle significatif influençant la réponse comme le montre les Figures 34a et b. Toutefois une différence subsiste à savoir que le CSL, le saccharose et le KH₂PO₄ affectent positivement la production d'antibiotiques comme le montrent les Figure 34a et b, alors que le facteur CaCl₂ produit un effet négatif sur la production antifongique telle que cela est indiqué dans la Figure 34c.

L'effet principal de chaque facteur sur la production d'antibiotiques a été calculé pour déterminer les conditions pouvant influencer positivement la production d'antibiotiques par la souche. Le Tableau 13 montre que parmi les sept (07) facteurs testés, le saccharose, le CSL et le KH₂PO₄ avaient les valeurs t les plus élevées, celles-ci étaient respectivement de 2,50 / 6,01 / 6,76 avec le SARM ; 2,28 / 5,31 / 7,92 avec BS et 2,23 / 9,35 / 3,83 avec UR.

3.1.2. Optimisation par Box Behnken design et « response surface methodology »

La méthodologie de surface de réponse (RSM) utilisant le plan Box-Behnken (BBD) a été appliquée pour étudier l'effet des trois variables significatives, CSL, saccharose et KH₂PO₄, sur l'activité antimicrobienne. BBD évalue les interactions entre les différentes variables et RSM trouve la concentration optimale de chaque variable pour une activité antibiotique maximale de *Sx. tamanrassetensis* SA198 contre les trois organismes tests.

Trois équations de régression ont été développées en tant que modèle polynomial de second ordre pour calculer les réponses de prédiction et donner les niveaux optimums de chaque variable.

$$Y_{(SARM)} = -87,9 + 54,8 \text{ KH}_2\text{PO}_4 + 4,19 \text{ sucrose} + 3,147 \text{ CSL} - 27,34 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,0750 \text{ sucrose} * \text{sucrose} - 0,02719 \text{ CSL} * \text{CSL} - 0,875 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{sucrose} - 0,031 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{CSL} - 0,0525 \text{ sucrose} * \text{CSL} \quad (2)$$

$$Y_{(BS)} = -79,22 + 39,37 \text{ KH}_2\text{PO}_4 + 3,183 \text{ Sucrose} + 3,000 \text{ CSL} - 16,56 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,0760 \text{ sucrose} * \text{sucrose} - 0,02662 \text{ CSL} * \text{CSL} - 0,375 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{sucrose} - 0,062 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{CSL} - 0,03750 \text{ sucrose} * \text{CSL} \quad (3)$$

$$Y_{(UR)} = -90,96 + 48,05 \text{ KH}_2\text{PO}_4 + 4,596 \text{ sucrose} + 2,756 \text{ CSL} - 10,08 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1245 \text{ sucrose} * \text{sucrose} - 0,02059 \text{ CSL} * \text{CSL} - 0,687 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{sucrose} - 0,3437 \text{ KH}_2\text{PO}_4 * \text{CSL} - 0,03750 \text{ sucrose} * \text{CSL} \quad (4)$$

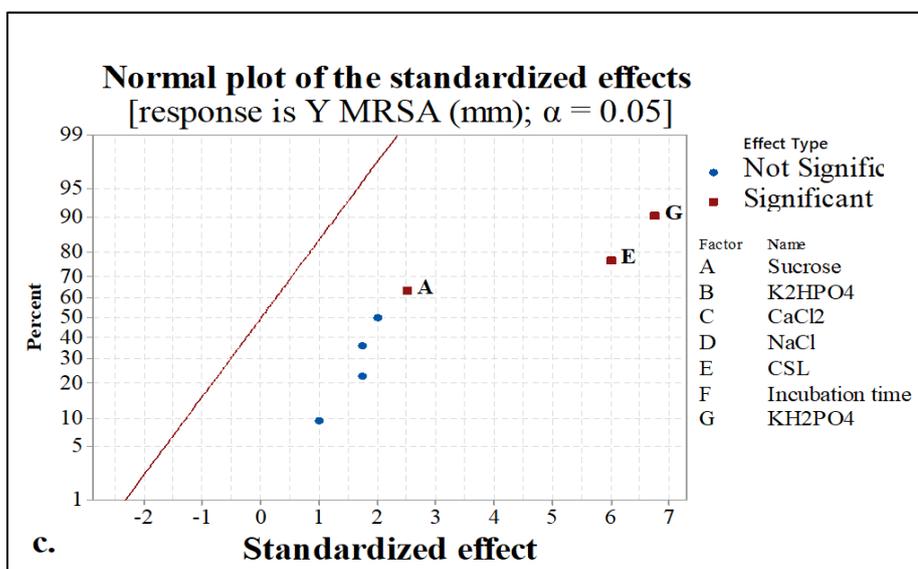
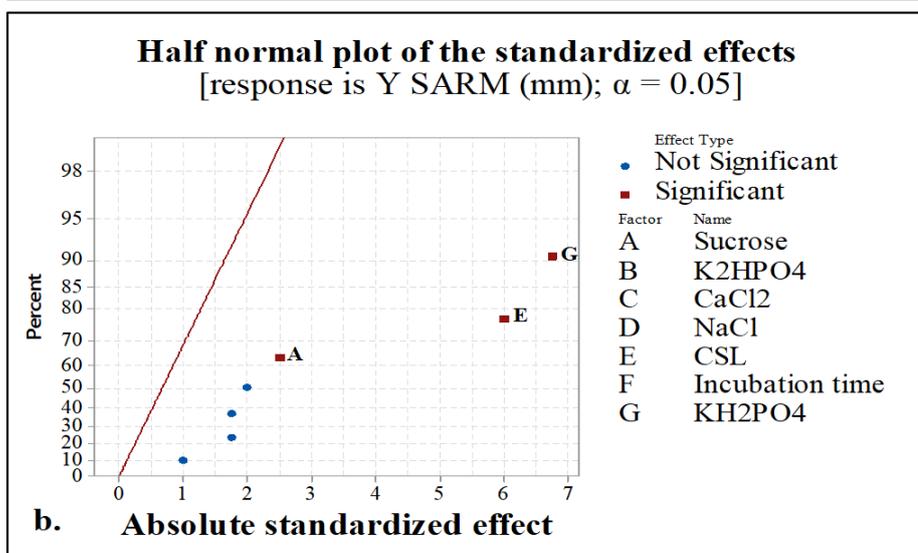
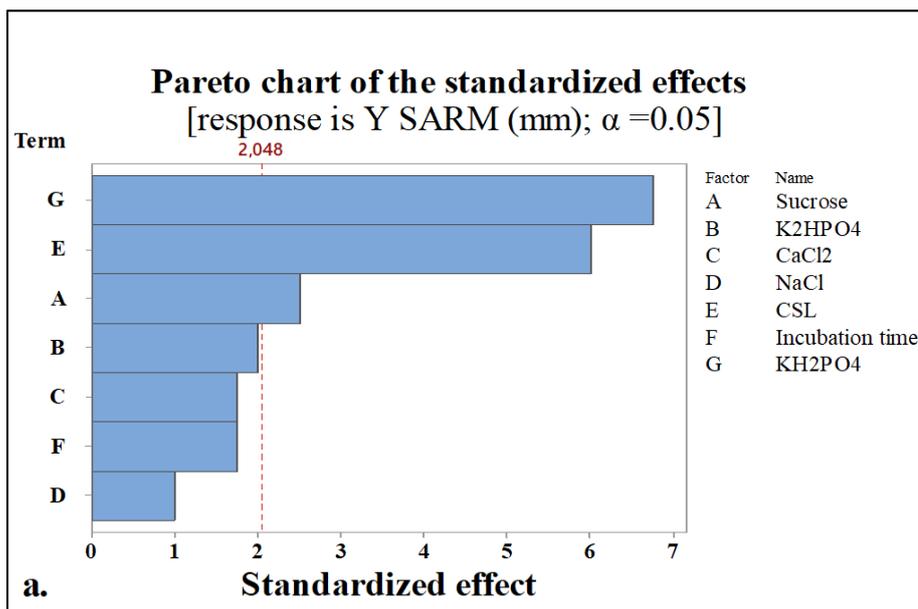


Figure 32. Effet des paramètres de culture étudiés dans le milieu MB-CSL-saccharose sur l'activité antibactérienne de la souche SA198 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* résistant à la Mécilline 639c.

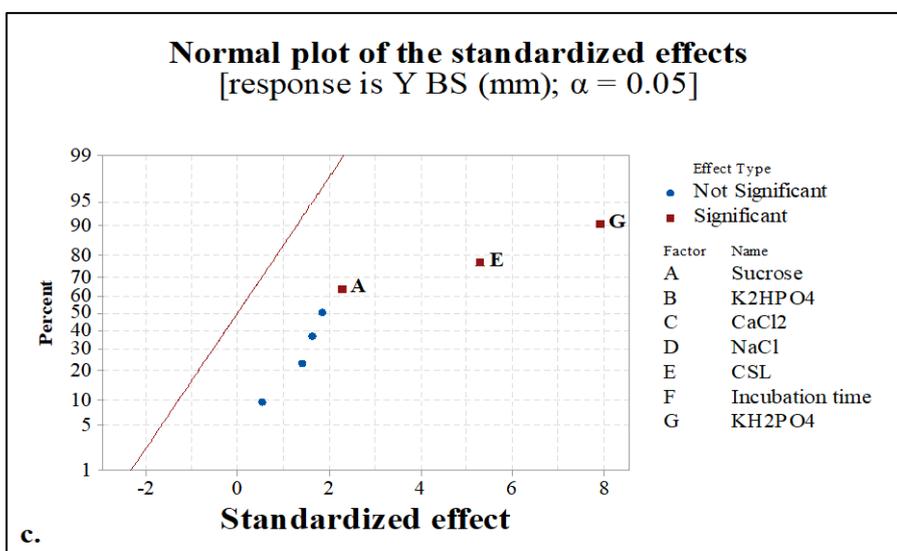
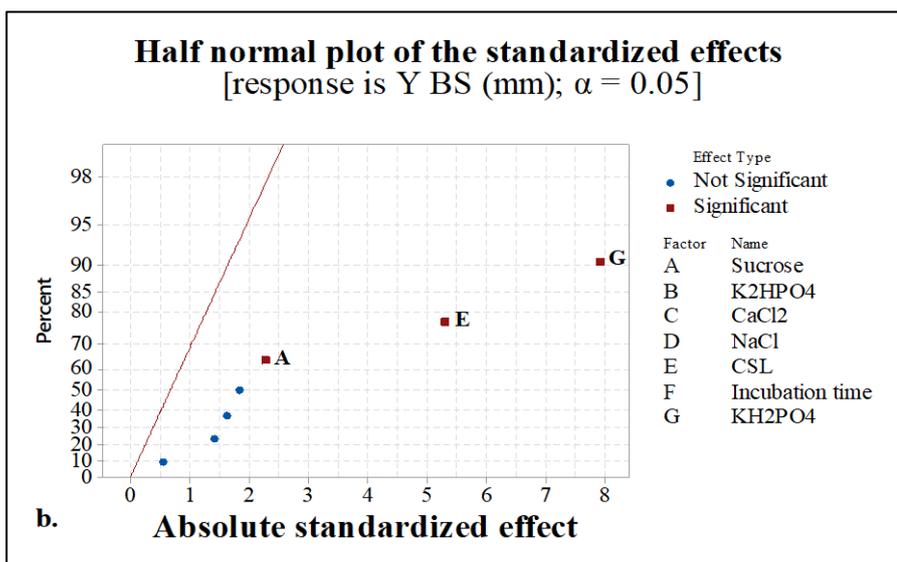
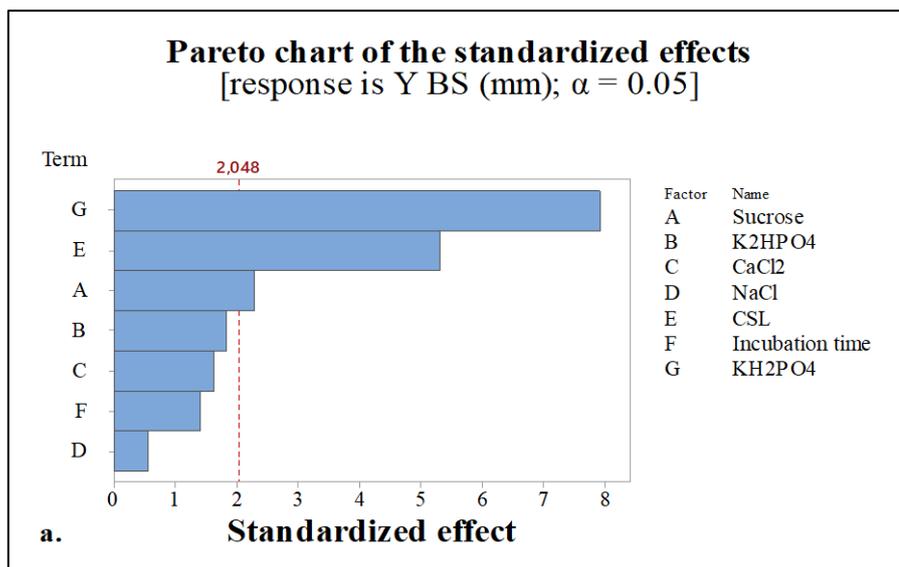


Figure 33. Effet des paramètres de culture étudiés dans le milieu MB-CSL-saccharose sur l'activité antibactérienne de la souche SA198 vis-à-vis de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

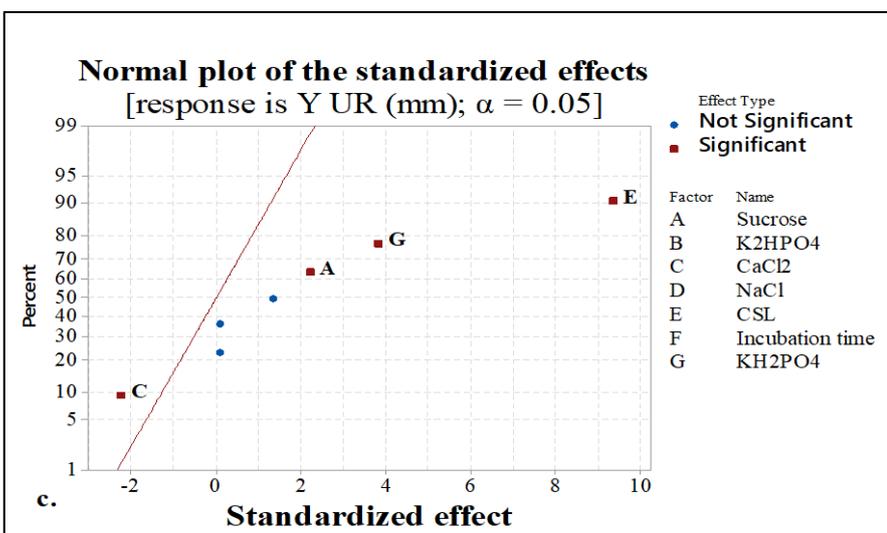
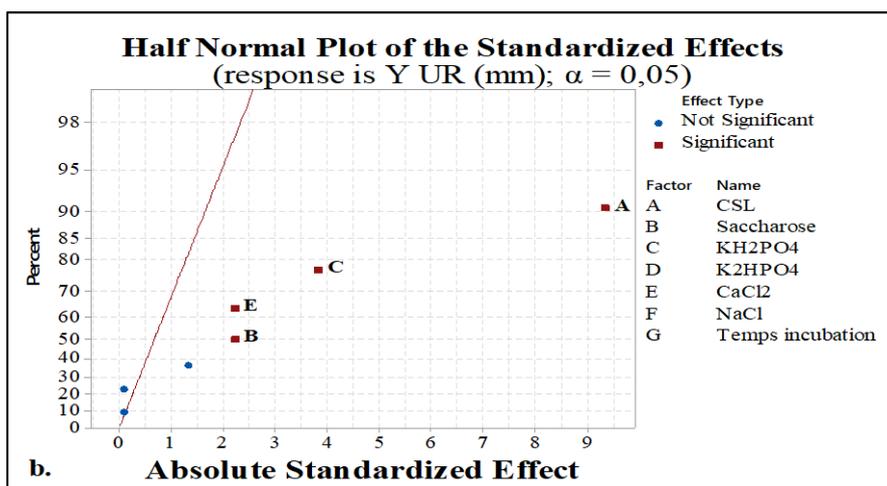
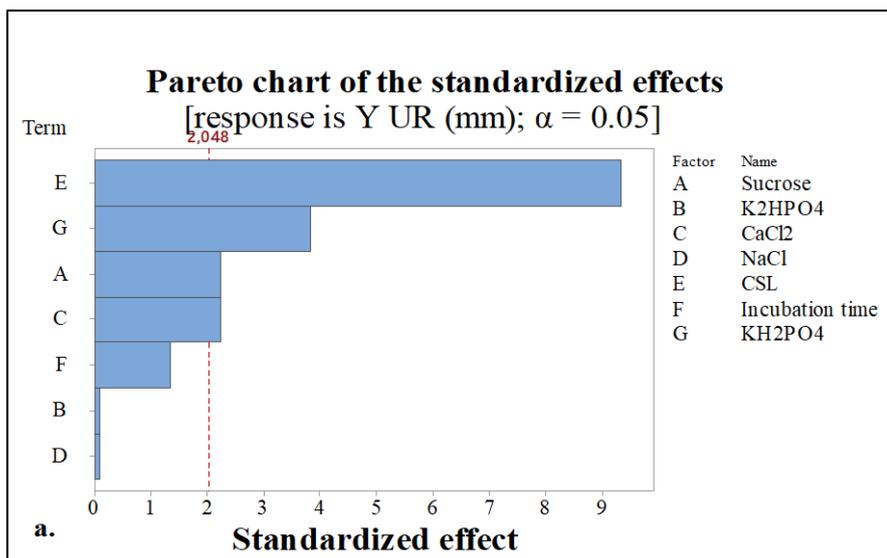


Figure 34. Effet des paramètres de culture étudiés dans le milieu MB-CSL-saccharose sur l'activité antibactérienne de la souche SA198 vis-à-vis de *Umbelopsis ramanniana* (NRRL 1829).

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 13. Plan Plackett-Burman et résultats des analyses de la variance pour la production antimicrobienne de *Saccharothrix tamanrassetensis* SA 198.

Facteurs	Codes	Effect			Coefficient			Valeur-t			Valeur-p		
		SARM	BS	UR	SARM	BS	UR	SARM	BS	UR	SARM	BS	UR
Constante					13,778	12,500	10,833	31,03	24,40	17,36	0,000	0,000	0,000
Saccharose	X ₁	2,222	2,333	2,778	1,111	1,167	1,389	2,50	2,28	2,23	0,018*	0,031*	0,034*
K₂HPO₄	X ₂	1,778	1,889	0,111	0,889	0,944	0,056	2,00	1,84	0,09	0,055	0,076	0,930
CaCl₂	X ₃	1,556	1,667	-2,778	0,778	0,833	-1,389	1,75	1,63	-2,23	0,091	0,115	0,034
NaCl	X ₄	0,889	0,556	0,111	0,444	0,278	0,056	1,00	0,54	0,09	0,325	0,592	0,930
CSL	X ₅	5,333	5,444	11,667	2,667	2,722	5,833	6,01	5,31	9,35	0,000*	0,000*	0,000*
Temps d'incubation	X ₆	1,556	1,444	1,667	0,778	0,722	0,833	1,75	1,41	1,34	0,091	0,170	0,192
KH₂PO₄	X ₇	6,000	8,111	4,778	3,000	4,056	2,389	6,76	7,92	3,83	0,000*	0,000*	0,001*

SARM = *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline 639c, BS = *Bacillus subtilis* ATCC 6633, UR = *Umbelopsis ramanniana* NRLL 1829, *Niveau de signification à 5%

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Où $Y_{(SARM)}$, $Y_{(BS)}$ et $Y_{(UR)}$ expriment l'activité antimicrobienne prédite (c'est-à-dire la zone d'inhibition) obtenue contre le germe correspondant.

Dans cette partie, un total de dix-sept (17) expériences ont été réalisées selon la matrice de conception, et les réponses prédites et observées ont été rapportées dans le [Tableau 14](#). A, B et C correspondent respectivement au CSL, saccharose et KH_2PO_4 . La valeur expérimentale obtenue la plus élevée pour la zone d'inhibition était de 26 mm, tandis que la réponse prédite basée sur la RSM était estimée à 25,0 mm dans l'essai n° 16 ([Tableau 14](#)).

Tableau 14. Plan Box-Behnken des variables significatives et leurs réponses.

Test N°	Valeurs codées			Distance d'inhibition (mm)								
	A	B	C	Observée			Prévue			Résiduelle		
	CSL	Saccharose	KH_2PO_4	Y_{SARM}	Y_{BS}	Y_{UR}	Y_{SARM}	Y_{BS}	Y_{UR}	Y_{SARM}	Y_{BS}	Y_{UR}
1	0	0	0	24,5	21	16	25,04	21,83	19,60	-0,54	-0,83	-3,60
2	0	0	0	24,5	21	19	25,04	21,83	19,60	-0,54	-0,83	-0,60
3	0	0	0	25,5	22	20	25,04	21,83	19,60	0,46	0,17	0,40
4	-1	-1	0	14	11	0	11,15	8,89	2,06	2,85	2,11	-2,06
5	1	0	1	19	16	14	14,16	13,06	15,57	4,84	2,94	-1,57
6	1	-1	0	16	14	16	17,15	13,67	15,57	-1,15	0,33	0,43
7	0	1	1	20	20	18	22,04	20,92	18,51	-2,04	-0,92	-0,51
8	1	0	-1	0	0	9	0,92	1,28	9,94	-0,92	-1,28	-0,94
9	0	-1	-1	14	13	9	12,04	12,14	8,50	1,96	0,86	0,50
10	0	0	0	24,5	22	19	25,04	21,83	19,60	-0,54	0,17	-0,60
11	-1	0	1	20	18	16	19,15	16,77	15,07	0,85	1,23	0,93
12	-1	1	0	19	12	8	17,93	12,39	8,44	1,07	-0,39	-0,44
13	-1	0	-1	0	0	0	4,93	3,01	-1,56	-4,93	-3,01	1,56
14	1	1	0	0	0	9	2,93	2,17	6,94	-2,93	-2,17	2,06
15	0	-1	1	25,5	23	23,5	29,27	26,41	22,38	-3,77	-3,41	1,12
16	0	0	0	26	23	22,5	25,04	21,83	19,60	0,96	1,17	2,90
17	0	1	-1	15,5	13	9	11,81	9,65	10,12	3,69	3,35	-1,12
Niveau	A (g/L) CSL			B (g/L) Saccharose			C (g/L) KH_2PO_4					
-1	30			5			0,1					
0	50			10			0,5					
1	70			15			0,9					

CSL= corn steep liquor, SARM = *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline 639c, BS = *Bacillus subtilis* ATCC 6633, UR = *Umbelopsis ramanniana* NRLL 1829.

Les résultats obtenus à partir du BBD sont ensuite interprétés par l'analyse de la variance (ANOVA). Les résultats sont réunis dans le [Tableau 15](#). L'ANOVA a démontré que les trois modèles (2, 3 et 4) étaient très significatifs, du fait de la très faible valeur de la probabilité p -value

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

(<0,0001) et du test F de Fisher (modèle F = 29,21 ; 38,78 et 39,05 pour SARM, BS et UR respectivement). Les trois modèles étaient également statistiquement non significatifs par rapport aux valeurs de F de manque d'ajustement (69,5 ; 36,50 et 12,375 pour SARM ; BS et UR respectivement) ce qui suggère que les valeurs expérimentales obtenues étaient donc bien ajustées par rapport aux modèles proposés.

Les valeurs des coefficients de régression t et p des variables CSL (A), saccharose (B) et KH_2PO_4 (C) pour l'activité antimicrobienne contre le SARM, BS et UR sont données dans le [Tableau 16](#) aux niveaux de signification de 95 et 99%. Une valeur t élevée et une valeur p faible indiquent que le coefficient correspondant est hautement significatif ([Tanyildizi et al., 2005](#)). Les résultats du [Tableau 16](#) montrent par ailleurs que les coefficients linéaires du CSL (A), KH_2PO_4 (C), ainsi que leurs coefficients quadratiques correspondants (A^2) et (C^2) mais aussi l'interaction entre le CSL et le saccharose (AB), ont été les facteurs les plus significatifs affectant ainsi la production d'activité contre les trois microorganismes testés, suivi du saccharose (B^2) et (B).

Les valeurs impliquant les concentrations du CSL(A) et du KH_2PO_4 (C) avaient une forte influence sur la production d'activité antimicrobienne et ce contre les trois germes testés ([Tableau 16](#)). Cependant, l'effet individuel du au saccharose (B) était seulement significatif à l'égard de la production de l'activité antibactérienne contre le SARM et le BS (valeur $p < 0,05$) et sans aucune influence sur l'activité antifongique contre le champignon UR. Toutefois, l'effet quadratique du saccharose (B^2) présentait une influence sur l'activité contre BS et UR, mais pas contre le SARM.

L'interaction mutuelle entre le CSL et le saccharose (AB) est considérée comme très importante et pour les trois modèles proposés $Y_{(\text{SARM})}$, $Y_{(\text{BS})}$ et $Y_{(\text{UR})}$ (valeur $p < 0,0001$) contrairement aux interactions (BC) et (AC). L'effet interactif du CSL et du KH_2PO_4 (AC) pour UR était significatif ($p < 0,001$), alors que les autres interactions étaient non significatives. En outre, les termes interactifs du saccharose avec KH_2PO_4 (BC) n'étaient pas significatifs à 1% ni à 5% pour le SARM, BS et UR. Le facteur linéaire de KH_2PO_4 (C) avec des coefficients positifs (6,875 ; 6,375 et 5,563 pour SARM, BS et UR respectivement) indiquent des effets hautement significatifs en faveur de l'augmentation de l'activité antimicrobienne contre les trois germes testés. Le facteur CSL (A) n'a qu'un seul coefficient positif (3.000) contre UR, ce qui indique un effet positif sur l'activité antifongique. Les autres facteurs restants reflétaient des effets entraînant la diminution de l'activité antimicrobienne.

Le coefficient de détermination (R^2) doit être toujours compris entre 0 et 1. Sa détermination permet de juger la qualité d'une régression linéaire simple de même qu'il rend compte de l'adéquation entre le modèle proposé et les données observées ou encore à quel point l'équation de régression est adaptée pour décrire la distribution des points. Les valeurs obtenues (R^2) étaient de

0,9163 ; 0,9357 et 0,9361 pour SARM, BS et UR respectivement (Tableau 16). Les résultats des activités antimicrobiennes obtenues contre SARM, BS et UR révèlent que 88,50% ; 91,15% et 91,21% respectivement des résultats observés pouvaient être attribués aux variables indépendantes influentes (CSL, saccharose et KH_2PO_4), et seulement 8,37% ; 6,43% et 6,39% respectivement, des variations totales de l'activité ne pouvaient être expliquées par les modèles correspondants (Tableau 16).

3.1.3. Représentations bi-dimensionnelles des courbes de niveaux

Les effets des trois variables indépendantes sur la production antimicrobienne ont été représentés sous forme de courbes de niveaux 2D dessinées et montrées par la Figure 35. Ces représentations graphiques ont été tracées en utilisant les valeurs des distances d'inhibition prévues à partir des modèles significatifs (2), (3) et (4). Chaque graphique 2D présente les effets interactifs de deux variables tandis que le troisième paramètre était fixé à sa valeur du point central (0). Les résultats fournissent une interprétation visuelle de l'emplacement des conditions expérimentales optimales.

La signification des interactions entre deux variables comparées est indiquée par un tracé de contour d'aspect elliptique (Muralidhar *et al.*, 2001), alors que la réponse maximale prévue est indiquée dans la plus petite ellipse du diagramme de contour (Feng *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2011).

Les Figures 35 a, b et c montrent les effets du CSL et du KH_2PO_4 sur l'activité antibiotique, alors que le saccharose était à son niveau moyen (10 g/L). Le graphique montre que le CSL n'a eu aucune interaction significative avec le KH_2PO_4 sur la production de l'activité antibactérienne contre le SARM et BS. Cela se reflète par la nature relativement circulaire des courbes de niveau (Fig. 35 a, b).

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 15. Analyse de la variance (ANOVA) des modèles expérimentaux pour la production de l'activité antimicrobienne contre les trois germes testés.

Source	dl	Somme des carrés			Somme des carrés ajustée			Moyenne des carrés ajustée			Valeur-F			Valeur-p			Signification
		SARM	BS	UR	SARM	BS	UR	SARM	BS	UR	SARM	BS	UR	SARM	BS	UR	
Modèle	9	2404,38	1964,66	1552,48	2404,38	1964,66	1552,48	267,15	218,29	172,50	29,21	38,78	39,05	<0,0001	<0,0001	<0,0001	Significatif
Lineaire	3	893,50	744,50	644,1	893,50	744,50	644,12	297,83	248,17	214,71	32,56	44,09	48,60	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Quadratique	3	1265,38	1101,16	720,22	1265,38	1101,16	720,23	421,79	367,05	240,07	46,12	65,21	54,34	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Intéactions	3	245,50	119,00	188,13	245,50	119,00	188,13	81,83	39,66	62,71	8,95	7,05	14,19	0,000	0,001	0,000	
Erreur	24	219,50	135,10	106,03	219,50	135,10	106,03	9,146	5,63	4,42	132,68	29,94	3,77	0,000	0,000	0,026	
Manque d'ajustement	3	208,50	109,50	37,13	208,50	109,50	37,13	69,500	36,50	12,37	13,26	29,94	3,77	0,0127	0,004	0,026	
Erreur pure	21	11,00	25,60	68,90	11,00	25,60	68,90	0,524	1,21	3,28							
Total	33	2623,88	2099,76	1658,5													

SARM = *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline 639c, BS = *Bacillus subtilis* ATCC 6633, UR = *Umbelopsis ramanniana* NRLL 1829, dl : degrés de liberté

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 16. Estimation des coefficients de régression et leurs niveaux de signification vis-à-vis de la production antimicrobienne contre les trois germes testés SARM, BS et UR d'après les résultats du plan Box-Behnken.

Terme	Coefficients			Coefficient de l'erreur standard			Valeur- <i>t</i>			Valeur- <i>p</i>		
	SARM	BS	UR	SARM	BS	UR	SARM	BS	UR	SARM	BS	UR
Constante	25,000	21,800	19,600	0,956	0,750	0,665	26,14	29,06	29,49	0,000**	0,000**	0,000**
A-CSL (L)	-2,250	-1,375	3,000	0,756	0,593	0,625	-2,98	-2,32	5,71	0,0007**	0,029*	0,000**
B-Saccharose (L)	-1,875	-2,000	-0,562	0,756	0,593	0,625	-2,48	-3,75	-1,07	0,021*	0,033*	0,295
C-KH₂PO₄ (L)	6,875	6,375	5,563	0,756	0,593	0,625	9,09	10,75	10,59	0,000**	0,000**	0,000**
AB (I)	-5,25	-3,750	-3,750	1,07	0,839	0,743	-4,91	-4,47	-5,05	0,000**	0,000**	0,000**
AC (I)	-0,25	-0,500	-2,750	1,07	0,839	0,743	-0,23	-0,60	-3,70	0,817	0,557	0,001**
BC (I)	-1,75	-0,750	-1,375	1,07	0,839	0,743	-1,64	-0,89	-1,85	0,115	0,380	0,077
A² (Q)	-10,87	-10,650	-8,237	1,04	0,818	0,724	-10,44	-13,03	-11,37	0,000**	0,000**	0,000**
B² (Q)	-1,87	-1,900	-3,112	1,04	0,818	0,724	-1,80	-2,32	-4,30	0,085	0,029*	0,000**
C² (Q)	-4,38	-2,650	-1,613	1,04	0,818	0,724	-4,20	-3,24	-2,23	0,000**	0,003**	0,036*

SARM : S = 2,37259 **R-sq = 0,9163 R-sq(adj) = 0,8850** ; BS : S = 2,37259 **R-sq = 0,9357 R-sq(adj) = 0,9115** ; UR : S = 2,10183 **R-sq = 0,9361 R-sq(adj) = 0,9121**, (L) : Linéaire ; (I) : Interaction ; (Q) : Quadratique, * Niveau de signification à 5%, **Niveau de signification à 1%

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

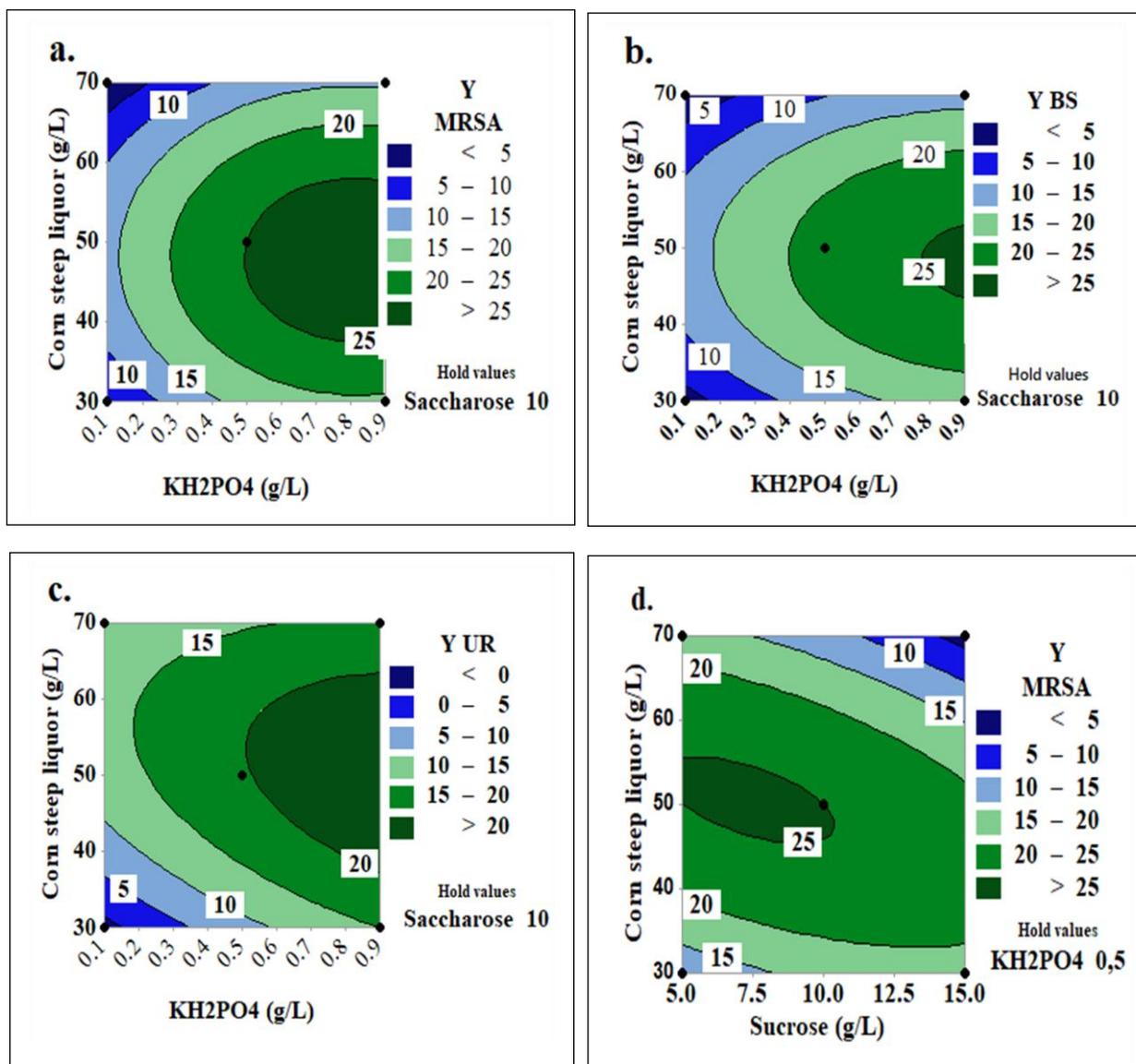
Lorsque la concentration de CSL était d'environ 50 g/L, l'augmentation de la concentration de KH_2PO_4 de 0,2 à 0,5 g/L a favorisé l'activité antibactérienne, qui est passée de 10 à 15 mm contre *B. subtilis* et de 10 à 20 mm contre SARM. L'augmentation de la concentration de KH_2PO_4 de 0,2 à 0,9 g/L, augmente de manière significative l'activité antibactérienne de 10 à 25 mm avec une concentration de CSL de 38 g/L. Cependant, s'agissant de l'activité antifongique contre *U. ramanniana* (Fig. 35c), il existe une interaction significative entre KH_2PO_4 et CSL. En effet, au-dessus de la concentration moyenne de KH_2PO_4 , l'activité antifongique augmente avec l'augmentation de la concentration de CSL de 31 à 52 g/L, alors que toute nouvelle diminution de ses valeurs induirait une diminution de cette activité. Les résultats obtenus sur les Figures 35 a, b et c démontrent que la concentration optimale de KH_2PO_4 serait d'environ 0,9 g/L et celle du CSL d'environ 50 g/L.

Les Figures 35 d, e et f présentent les effets du saccharose et du CSL sur l'activité antimicrobienne, tandis que la concentration de KH_2PO_4 est fixée au niveau central (0,5 g/L). Les courbes des niveaux de concentration dans chaque cas étaient de nature elliptique, indiquant qu'il y avait une interaction mutuelle entre le saccharose et le CSL. Cela signifie aussi que la production d'antibiotiques dépendait des concentrations de CSL et de saccharose. A la concentration moyenne de saccharose, on peut voir que l'augmentation de la concentration de CSL de 32 à 50 g/L augmentait l'activité antibiotique de 0 à 16 mm, de 0 à 20 mm et de 0 à 24 mm contre UR, BS et SARM respectivement. En d'autres termes, la zone vert foncé (Figure 35 d, e et f) traduit une inhibition microbienne maximale survenant à une concentration optimale de CSL et sous un niveau moyen de saccharose. Cependant, toute augmentation supplémentaire de ces concentrations diminuerait ces activités. Ces observations suggèrent une concentration optimale de CSL qui serait de 52 g/L.

Les Figures 35 g, h et i illustrent les effets du KH_2PO_4 et du saccharose sur l'activité antibiotique, tandis que la concentration de CSL était maintenue au niveau moyen (50 g/L). Les formes des tracés de contour étaient de nature circulaire, ce qui indiquait une interaction mutuelle non significative entre KH_2PO_4 et le saccharose, en présence des trois microorganismes testés. Il a été remarqué qu'un niveau élevé de KH_2PO_4 (0,9 g/L) interagissait favorablement avec un faible niveau de saccharose (moins de 10 g/L) et augmentait l'activité antibiotique comme exprimée par la zone vert foncé. Ces tracés montrent également que tout changement de concentration de saccharose au-delà du niveau moyen ne produit aucun effet considérable sur les activités antibiotiques. Dans ce cas, les activités

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

antimicrobiennes étaient supérieures à 28, 25 et 22 mm contre SARM, BS et UR respectivement. Des augmentations de la concentration de saccharose au-dessus du niveau optimal inverseraient la tendance. L'analyse des Figures 35 g, h et i révèle enfin que la concentration optimale de saccharose était d'environ 7 g/L.



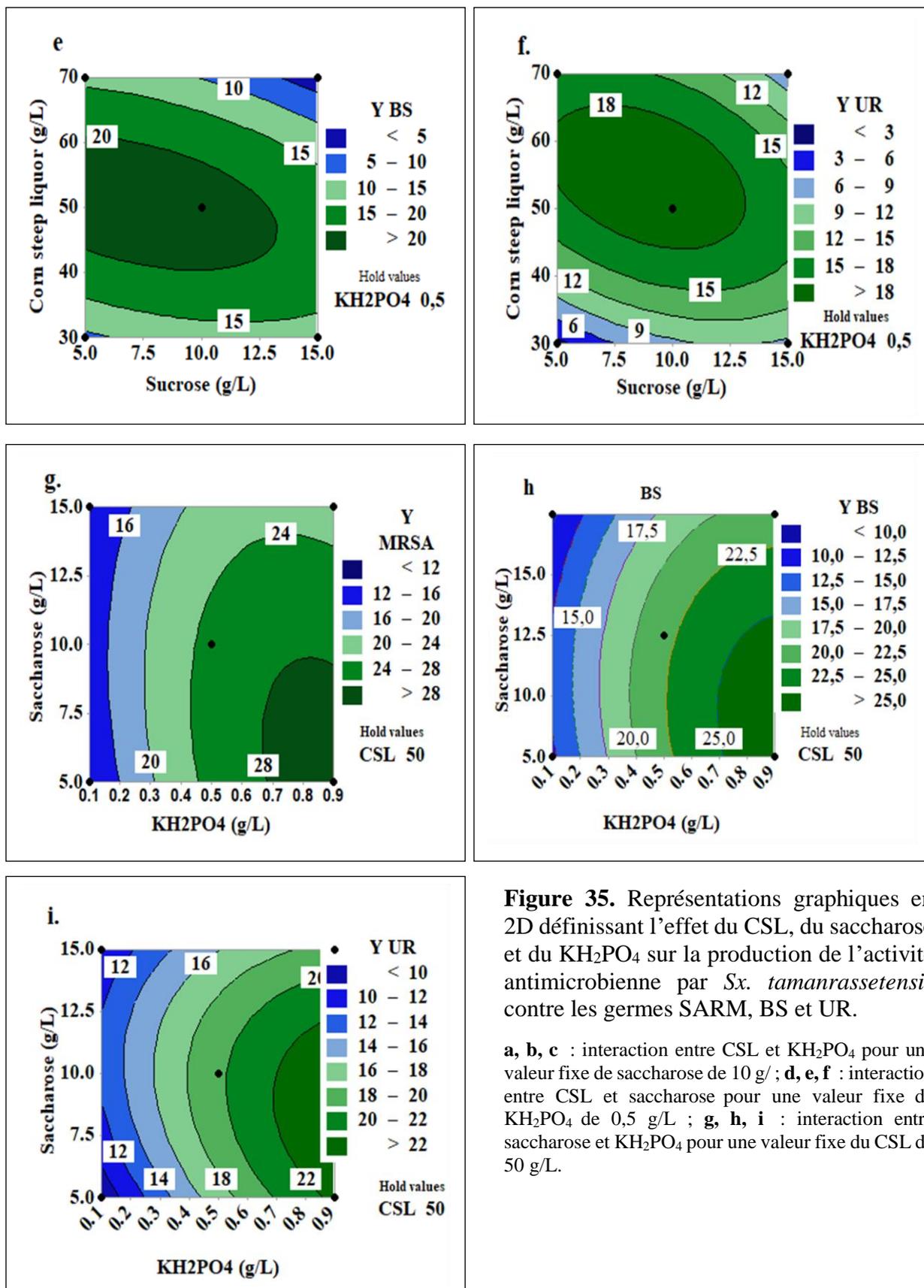


Figure 35. Représentations graphiques en 2D définissant l'effet du CSL, du saccharose et du KH₂PO₄ sur la production de l'activité antimicrobienne par *Sx. tamanrassetensis* contre les germes SARM, BS et UR.

a, b, c : interaction entre CSL et KH₂PO₄ pour une valeur fixe de saccharose de 10 g/ ; **d, e, f** : interaction entre CSL et saccharose pour une valeur fixe de KH₂PO₄ de 0,5 g/L ; **g, h, i** : interaction entre saccharose et KH₂PO₄ pour une valeur fixe du CSL de 50 g/L.

3.1.4. Validation des modèles expérimentaux

Les expériences de culture réalisées dans des fioles Erlenmeyer et les résultats des tests d'antibiogramme répétées trois fois sont réunis dans le [Tableau 17](#). Les valeurs optimisées des facteurs nutritifs importants et prédites à partir du procédé RSM illustrées par la [Figure 36](#) ont été validées expérimentalement. Les valeurs d'activités antimicrobiennes maximales obtenues expérimentalement sont de $33 \pm 1,00$ mm contre SARM, de $28 \pm 2,00$ mm contre BS et de $30 \pm 2,00$ mm contre UR. Celles-ci étaient en accord étroit avec les valeurs prévues par les trois modèles $Y_{(SARM)}$, $Y_{(BS)}$ et $Y_{(UR)}$ de 29 mm ; 26 mm et 24 mm respectivement. Par conséquent, les modèles développés sont considérés comme efficaces et en accord pour l'amélioration de l'activité antimicrobienne de *Sx. tamanrassetensis* SA198.

La composition du milieu de culture final optimisé pour une activité antimicrobienne maximale de *Sx. tamanrassetensis* SA 198 a été établie comme suit : 52 g de corn steep liquor (CSL); 7 g de saccharose ; 0,9 g de KH_2PO_4 ; 2 g de NaCl ; 1 g de $CaCl_2$; 1 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 L d'eau distillée ; pH 7,2.

Tableau 17. Validation des concentrations optimales des variables en condition non optimisé et optimisées sur l'activité antimicrobienne de la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198.

Variable	Concentration (g/L)		Germe	Activité antimicrobienne (Distance d'inhibition en mm \pm sem) ^a		
	Non optimisé	Optimisé		Avant optimisation	Optimisée (Prédite)	Optimisée (Expérimentale)
CSL	50	52	SARM	$25 \pm 1,00$	29 ± 1	$33 \pm 1,00$
Saccharose	10	7				
KH_2PO_4	0,5	0,9				
			BS	$22 \pm 1,00$	$26 \pm 1,00$	$28 \pm 2,00$
			UR	$22 \pm 1,80$	24 ± 1	$30 \pm 2,00$

^a Valeurs moyennes de trois répétitions avec l'erreur type de la moyenne ; SARM : *Staphylococcus aureus* 639c résistant à la méticilline ; UR : *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 ; BS : *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

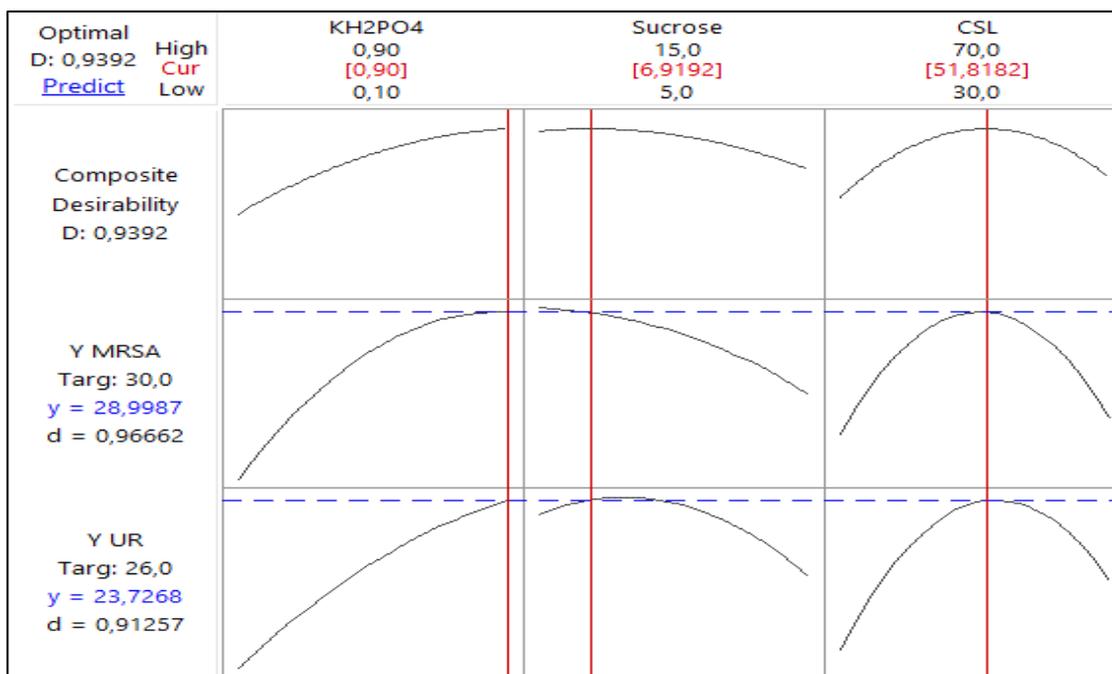


Figure 36. Concentrations optimales recommandées des composés CSL, KH₂PO₄ et saccharose dans le milieu semi-synthétique optimisé pour atteindre une activité antimicrobienne maximale produite par *Sx. tamanrassetensis* SA198.
SARM : *Staphylococcus aureus* 639c résistant à la mêticilline ; UR : *Umbelopsis ramanniana* NRRL

3.2. Discussion

L'utilisation des méthodes statistiques, tels que les plans d'expériences ou DOE pour « Design of experiments » dans un processus d'optimisation de milieu de culture peut amener à corriger les limites imposées par la méthode classique dite « un facteur à la fois » et être un outil performant pour l'optimisation de la production de métabolites (Singh, 2017). Lors d'une recherche de production de métabolites le type de nutriments et leurs concentrations dans le milieu jouent un rôle important dans le début de la production de métabolites primaires et par la suite secondaires, et limiter l'apport d'un nutriment essentiel peut limiter la croissance des cellules microbiennes ou la formation de produits (Elibol, 2004; Chen *et al.*, 2012; El-Naggar *et al.*, 2015; Singh, 2017). Par ailleurs, au sein du LBSM et du LGC, l'essentiel des recherches est axé sur la production de métabolites secondaires, et la méthode d'optimisation classique était celle qui était couramment entreprise. Compte tenu de ces éléments, la méthodologie statistique présentait une direction nouvelle pouvant nous amener à revoir dans l'idéal nos protocoles de recherches.

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Chez les actinobactéries, la détermination des facteurs influençant la synthèse des molécules bioactives est une étape déterminante pour aboutir à de meilleurs rendements de production (Rafieenia, 2013; Singh *et al.*, 2017). L'optimisation de ces facteurs hautement influents peut être effectuée au moyen de la méthodologie de surface de réponse avec des outils statistiques (Wang *et al.*, 2011; Kanmani *et al.*, 2013). Durant les étapes d'optimisation entreprises dans notre étude, les sources nutritives capitales saccharose, KH_2PO_4 et CSL ont joué un rôle crucial dans la production de l'activité antimicrobienne.

Les résultats du plan Box-Behnken, combinés à ceux obtenus de l'ANOVA, suggèrent l'existence d'une relation directe entre les concentrations des trois variables étudiées saccharose, KH_2PO_4 et CSL dans le milieu de culture et l'augmentation ou la diminution de l'activité antimicrobienne. De plus, l'activité antibactérienne et/ou l'activité antifongique dépendaient de ces concentrations. Nos résultats ont montré que l'augmentation de la concentration de KH_2PO_4 a favorisé l'activité antimicrobienne, alors que l'augmentation de la concentration de CSL n'a pu améliorer que l'activité contre le champignon *Umbelopsis ramanniana*. Signalons que, les coefficients négatifs ayant été attribués à certains facteurs et autres interactions indiquaient la présence d'une valeur d'activité maximale ne pouvant évoluer dans ces cas-là.

Le coefficient de détermination (R^2) compris entre 0 et 1 a permis d'évaluer l'adéquation des modèles prédits par le logiciel statistique de traitement des données observées. Les valeurs de R^2 proches de 1 reflétaient un très bon ajustement entre la réponse observée et la réponse prédite ce qui valide les résultats de la production d'activités antimicrobiennes obtenues expérimentalement ainsi que ceux prévus pour chaque modèle. Autrement dit, les résultats obtenus indiquaient que les équations de réponse $Y_{(SARM)}$; $Y_{(BS)}$ et $Y_{(UR)}$ ont fourni des modèles appropriés pour l'optimisation des processus de l'activité antimicrobienne de *Sx. tamanrassetensis* SA198.

D'autres études utilisant l'optimisation statistique ont rapporté l'implication et l'impact des composés saccharose, KH_2PO_4 et CSL dans des processus de biosynthèse. C'est le cas du KH_2PO_4 qui à 1 g/L a produit un effet doublement positif sur la croissance mycélienne et la biosynthèse d'exopolysaccharides par *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109 (Xiao *et al.*, 2004). La présence de KH_2PO_4 à 0,2 g/L a été un facteur déterminant pour la synthèse de citrinine une mycotoxine produite par *Monascus ruber* (Al-Sarrani *et al.*, 2006), où encore à 1,05 g/L pour la production d'acide lactique par *Rhizopus oryzae* (Yao *et al.*, 2009). Dans une étude plus récente pour la production d'une nouvelle protéine aux propriétés antifongiques et antitumorales par *Aspergillus giganteus* MTCC

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

8408, l'apport d'un excès en phosphate par le KH_2PO_4 (0,1 g/L) et en présence de CSL (20 g/L) dans le milieu stimulaient le taux de croissance du champignon et la production de la molécule protéique active (Dutta et Das., 2017). L'implication positive du saccharose a été aussi mise en avant dans divers travaux de recherche, en tant que source de carbone bon marché. Ce sucre est préféré au très onéreux glucose. C'est ainsi que Kiruthika et al. (2011) a mis en évidence que 2 g/L de saccharose suffisait à améliorer la quantité de biomasse de *Exiguobacterium* sp. HM 119395 une bactérie marine. La production de l'antibiotique pikromycine par *Streptomyces venezuelae* s'est trouvée liée à la présence dans le milieu du saccharose à une concentration optimale de 139 g/L (Yi et al., 2015). L'activité antifongique de *Xenorhabdus stockiae* a été augmentée de 27,22 % par rapport au milieu originel de production par l'ajout de saccharose avec une concentration optimisée de 3,24 g/L (Sa-uth et al., 2018). Enfin, plus récemment, Zhang et al. (2020) a déduit que 64,8 g/L de saccharose était la quantité optimale pour accroître le métabolisme biosynthétique ainsi que la croissance de *Bacillus amyloliquefaciens*-9. L'efficacité du CSL en tant que sous-produit largement utilisé dans les bioprocédés détient encore des secrets sur la raison pour laquelle il a un tel impact positif sur les performances de ces processus (Hofer et al., 2018). Nombre de travaux le confirment d'ailleurs, comme celui de Yu et al. (2008) où la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* est influencée par la présence du CSL dans le milieu comme seule source d'azote à une concentration optimale de 42,54 g/L. Les auteurs de ce travail ont conclu notamment à une amélioration de la production de 30,4% par rapport au milieu non optimisé et de plus à un rendement et une productivité volumétrique d'acide lactique de 96 % et 4,58 g/L par heure, respectivement. Le travail d'optimisation de la synthèse de la protéine antifongique menée par Dutta et Das. (2017) et cité plus haut a révélé outre le KH_2PO_4 , le CSL en tant que paramètre significatif à une concentration optimale de 20 g/L et une amélioration de production de 59,4% par rapport aux conditions non optimisées. Cette même étude insiste sur l'opportunité qu'offre la méthodologie d'optimisation statistique à promouvoir une conception économique au niveau industriel pour la production de molécules d'intérêt médical. Deux autres études plus récentes portant sur l'amélioration de la production de l'acétoïne par *Bacillus subtilis* CICC 10025 ont abouti à remplacer dans le milieu de production originel, les sources d'azote organiques onéreuses (extrait de levure et extrait de bœuf) par uniquement le CSL à 15 g/L ce qui a donné des résultats satisfaisants puis ils ont porté le procédé à l'échelle du bioréacteur et ont multiplié par six la concentration d'acétoïne élaborée (63,43 g/L) (Taiwo et al., 2018a; 2020).

Le milieu MB-CSL-saccharose optimisé a entraîné une augmentation de l'activité antimicrobienne de 32% contre le SARM, 27% contre *B. subtilis* et 36% contre *U. ramanniana*, par rapport au milieu non optimisé. Ces résultats encouragent fortement l'utilisation de la RSM pour l'optimisation des paramètres de culture. Le milieu de culture optimal obtenu est utilisé dans la dernière partie de l'étude pour la production en fermenteur et l'étude des molécules bioactives produite par la souche SA198.

IV. PURIFICATION DES ANTIBIOTIQUES

1. Extraction des substances antimicrobiennes

Pour l'extraction des substances antimicrobiennes, une culture de *Sx. tamanrassetensis* est effectuée dans un réacteur en batch pendant 8 jours sur le milieu de culture optimisé composé de : saccharose 7 g ; corn steep liquor 52 g ; KH_2PO_4 0,9 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g ; K_2HPO_4 1 g ; NaCl 2 g ; CaCl_2 1 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; $\text{pH} \approx 7,2$. A la fin de la fermentation, l'extraction des composés actifs a été réalisée à partir du filtrat de culture (avec différents solvants organiques) et à partir de la biomasse (avec le méthanol). Les différents extraits obtenus ont été concentrés et testés par antibiographie par la méthode des puits contre *S. aureus* SARM 639c et *U. ramanniana* NRRL 1829.

1.1. Extraction à partir du filtrat de culture

Les résultats des tests d'antibiographie effectués sur les extraits organiques et aqueux sont illustrés dans le [Tableau 18](#). Pour les extraits organiques, seul l'extrait au dichlorométhane a montré une activité. Aucune activité n'est décelée avec les extraits des trois autres solvants.

Les phases aqueuses présentent toutes des inhibitions. L'activité la plus importante est observée dans la phase aqueuse obtenue après extraction au dichlorométhane. Les résultats obtenus pour les phases, organique et aqueuse, après extraction au dichlorométhane sont illustrés par la [Figure 37](#).

Tableau 18. Activités antimicrobiennes des extraits des phases aqueuses et organiques.

	<i>n</i> -hexane		Dichlorométhane		Acétate d'éthyle		<i>n</i> -butanol	
	SARM	UR	SARM	UR	SARM	UR	SARM	UR
Phase organique	0	0	17	15	0	0	0	0
Phase aqueuse	18	14	24	20	20	10	14	12

Les valeurs correspondent aux diamètres des zones d'inhibition en mm et comprennent le diamètre du puits (7 mm).

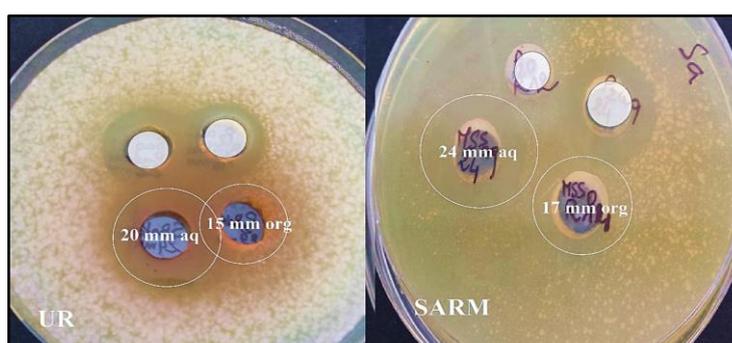


Figure 37. Activités contre *U. ramanniana* NRRL 1829 (à gauche) et *S. aureus* SARM 639c (à droite) des extraits de la phase organique (org) et aqueuse (aq) issus du filtrat de culture de la souche SA198 testés par antibiographie.

1.2. Extraction à partir du mycélium

Les extraits méthanoliques issus de la biomasse mycélienne n'ont montré aucune activité contre les microorganismes tests (SARM et UR). De ce fait, le mycélium est écarté.

1.3. Discussion

Contrairement aux résultats présentés par Boubetra (2013), l'extrait aqueux est dans notre cas plus actif que l'extrait organique (au dichlorométhane). Cette constatation nous a incité à vérifier notre résultat. Pour cela, le test d'antagonisme des phases organiques et aqueuses obtenues de différentes cultures est refait plusieurs fois. Les résultats ont tous montré que l'extrait organique est moins actif que l'extrait aqueux, et parfois même faiblement actif. De ce fait, nous avons entrepris un ensemble de tests de vérification.

2. Tests de vérification

2.1. Vérification de la production dans le milieu ISP2

Dans le travail de référence réalisé par [Boubetra \(2013\)](#) et [Boubetra et al. \(2013a\)](#), la production des antibiotiques a été étudiée dans le milieu complexe ISP2. Sachant qu'un changement simple dans la composition du milieu de culture peut influencer sur la production des antibiotiques, nous avons voulu vérifier si l'extraction au dichlorométhane à partir du milieu ISP2 permettait de retrouver l'activité dans la phase organique comme dans le travail de référence. Pour cela, il a été procédé à la comparaison d'un inoculum de la souche SA198 de notre travail noté «SA198-S1» à un spécimen de la même souche de référence utilisé par [Boubetra](#) noté «SA198-S2» récupéré au niveau de la banque de souche du LBSM et sous forme d'un tube incliné conservé.

La souche SA198-S1 et la souche de référence SA198-S2 sont mises en culture séparément sur un milieu ISP2 et sur un milieu MB-CSL-saccharose. Les quatre (04) cultures sont conduites parallèlement et dans les mêmes conditions de préparation et de fermentation. Au bout de huit (08) jours de culture, une extraction au dichlorométhane a été réalisée sur le filtrat de chacune des quatre cultures. Les phases organiques et aqueuses récupérées séparément, sont concentrées et testées contre la bactérie SARM et le champignon UR.

Les conclusions des tests d'antibiogramme réalisés par la méthode de diffusion des puits d'agar, sur les filtrats de culture en présence de la souche utilisée dans notre travail SA198-S1 sont identiques à ceux obtenus avec la souche de référence SA198-S2. Encore plus, après extraction au dichlorométhane, les tests effectués sur les extraits organiques et aqueux ont montré aussi des observations similaires et ce, pour les deux souches que ce soit sur ISP2 ou sur MB-CSL-saccharose. Ces résultats se traduisaient par, la prédominance de l'activité antimicrobienne dans la partie aqueuse au détriment de la phase organique qui était très peu active.

Il est à signaler que lors des travaux antérieurs sur la production des antibiotiques par la souche SA198, une grande variabilité dans la production de l'activité antimicrobienne avait été observée. Ces problèmes de reproductibilité des résultats étaient récurrents et pouvaient se manifester à différents niveaux. Ainsi, que ce soit dans notre étude (rapportée plus haut dans la partie Cinétique de production dans le milieu ISP2) ou celle de [Laassami \(2015\)](#), des différences entre les trois essais (répétitions) et ce pour la même source nutritionnelle (le même milieu de culture) et dans des conditions de culture identiques ont été observées. Les différences entre les

répétitions se traduisaient par des couleurs différentes du filtrat de culture (brune, rouge et beige). Dans la fiole d'Erlenmeyer où apparaît la couleur brune, la production d'antibiotiques a lieu normalement. Par contre, dans les fioles où la couleur est rouge ou beige, aucune production n'est détectée. De ce fait, la production de l'activité antimicrobienne était décelable visuellement par la couleur brune du filtrat de culture. Ces résultats hétérogènes ont été rapportés par [Laassami \(2015\)](#) et par [Boubetra](#) (communication personnelle).

Lors de nos travaux les soucis de reproductibilité ont retardé voire suspendu le déroulement de nos expériences. En effet, la souche SA198, ne montrait pas une production stable de l'activité antimicrobienne, et ce malgré les essais répétés et entrepris dans des conditions strictement identiques aux travaux de référence. Pour rappel, la purification des antibiotiques dans le travail de référence s'effectuait sur les extraits issus des phases organiques (extraction sur le filtrat de culture au dichlorométhane). Or, dans notre cas, il a été noté une diminution des activités antimicrobiennes mesurées sur ces extraits issus des phases organiques.

2.2. Vérification de l'identité de la souche SA198

Afin de s'assurer qu'on est vraiment en présence de *Saccharothrix tamanrassetensis*, un test de vérification de l'identité de la souche «SA198-S1 » (avec laquelle nous travaillons) est effectué par le séquençage de l'ARNr 16S.

Les résultats de l'alignement des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S par le blast matche parfaitement avec les séquences de la souche de référence *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947.

L'essai physiologique appuyé par l'analyse moléculaire, ont permis de confirmer que c'est bien *Sx. tamanrassetensis* DSM 45947 dont le métabolisme a changé.

3. Purification des antibiotiques par HPLC

3.1. Purification de l'extrait organique

L'extrait sec organique jaune solubilisé dans du méthanol est injecté en HPLC dans une colonne en phase inverse. Le programme utilisé dans ce travail suit un gradient continu de 30 à 100% de méthanol-eau pendant 40 min. À 220 nm, tous les produits sont détectés, qu'ils soient colorés ou non. Alors qu'à 260 nm, seuls les produits colorés en jaune sont détectés.

Le profil du chromatogramme obtenu suite à cette injection en HPLC analytique a montré la présence de 16 pics principaux numérotés de 1 à 16 ([Figure 38](#)). Chaque pic numéroté a été collecté

séparément, concentré à sec, re-dissout chacun dans 250 µL de méthanol, puis testé par antibiographie contre SARM et UR (100 µL par puit).

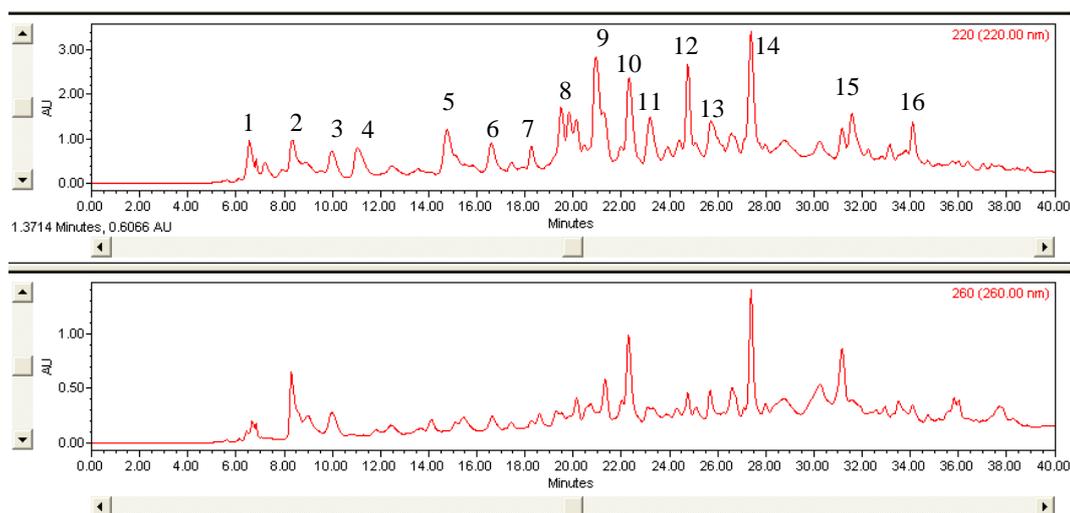


Figure 38. Profil HPLC de l'injection de l'extrait organique brut issu du filtrat de culture. Conditions d'élution : colonne C18, système de solvant à gradient linéaire continu, gradient méthanol-eau 30-100% ; débit, 1,5 mL/min ; détection, 220 et 260 nm.

Le [Tableau 19](#) regroupe les résultats de l'activité antimicrobienne, de la couleur et du temps de rétention de chaque pic du profil de la [Figure 38](#). L'activité antimicrobienne de l'extrait organique (au dichlorométhane) a été détectée dans les fractions éluées entre 20 et 34,40 mn. Une activité faible à modérée (≤ 12 mm) a été détectée dans les fractions correspondant aux pics 12 (TR⁵ 24,92 mn) et 14 (TR 27,52 mn). Une faible activité antibactérienne et antifongique (≤ 10 mm) a été détectée dans les pics 9, 10, 13, 15 et 16, alors qu'aucune activité n'a été observée contre SARM et UR au niveau des pics 1 à 8. Etant donné les faibles activités enregistrées avec les pics issus de l'extrait organique nous avons jugé abandonner la purification de l'extrait organique, et continuer le travail sur la phase aqueuse.

⁵ Temps de rétention

Tableau 19. Activités antimicrobiennes, temps de rétention et couleurs des principaux pics obtenus lors de la première injection HPLC de l'extrait organique.

Pics	Temps de rétention (mn)	Couleur	Activité antimicrobienne (Diamètre d'inhibition en mm)	
			SARM	UR
1	6,60	Non coloré	-	-
2	8,55	Non coloré	-	-
3	10,02	Non coloré	-	-
4	11,22	Non coloré	-	-
5	14,75	Non coloré	-	-
6	16,53	Non coloré	-	-
7	18,14	Non coloré	-	-
8	19,51	Non coloré	-	-
9	20,90	Non coloré	9	8,5
10	22,40	Non coloré	10	9
11	23,19	Non coloré	8,5	9
12	24,92	Non coloré	11	11
13	25,75	Non coloré	9	9
14	27,52	Jaune clair	12	11,5
15	31,50	Jaune clair	9	10
16	34,40	Jaune clair	8,5	9

(-) = pas d'activité. Les valeurs des diamètres d'inhibition comprennent le diamètre du puits (7 mm).

3.2. Purification de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux de couleur brune a été dissout dans de l'eau ultrapure et analysé par HPLC à travers une colonne amphiphile selon un programme indiqué dans le [Tableau 11 \(p. 65\)](#). Le profil d'élution obtenu suite à cette injection a mis en évidence la présence de neuf pics principaux numérotés de A1 à A9 (A pour aqueux) ([Figure 39](#)).

L'élution des pics a été faite à 220 nm et à 254 nm. Les neuf pics ont été collectés chacun séparément, concentrés à sec, re-dissouts dans 250 µL d'eau ultra pure, puis testés par antibiographie contre SARM et UR (100 µL par puit). Les résultats de l'activité antimicrobienne, de la couleur et du temps de rétention de chacune des fractions, sont réunis dans le [Tableau 20](#).

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Sept pics, A1, A2, A3, A5, A6, A7 et A8 ont présenté une activité. Celle-ci est à la fois contre SARM et UR, à l'exception du pic A3 qui n'est actif que contre SARM. L'activité antifongique contre UR était très forte à forte, avec les fractions A1 (42 mm), A2 (40 mm) et A5 (28 mm). Une forte activité antibactérienne est notée pour la fraction A5 (30 mm) et les fractions A7 et A8 (22 mm chacune). En revanche, aucune activité n'est observée pour les fractions A4 (TR 13,67) et A9 (TR 27,57).

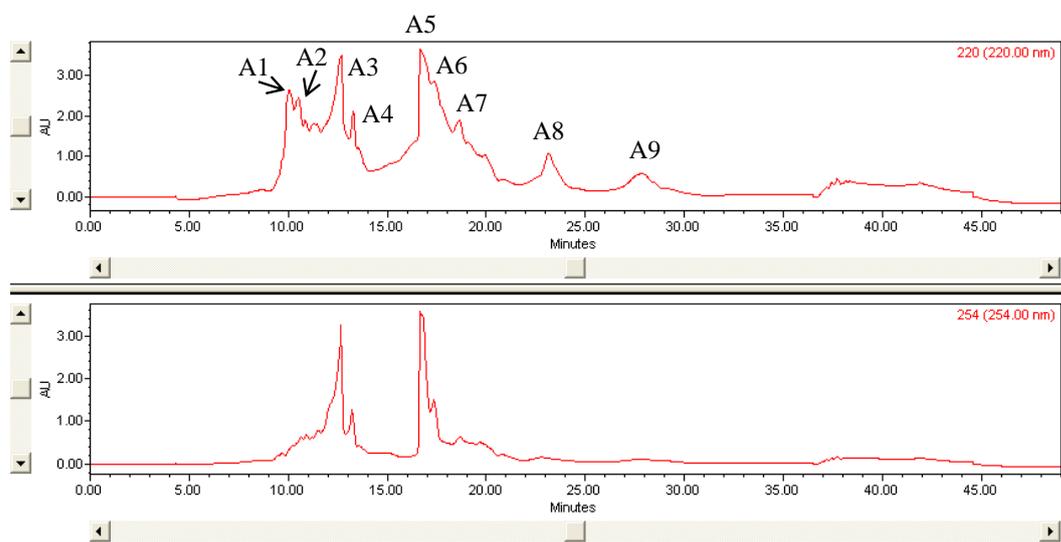


Figure 39. Profil HPLC de l'injection de l'extrait aqueux brut issu du filtrat de culture. Conditions d'élution : colonne amphiphile, système de solvant à gradient discontinu ; débit, 1,5 mL/min ; détection, 220 et 254 nm.

Tableau 20. Activités antimicrobiennes, temps de rétention et couleurs des principaux pics obtenus lors de la première injection HPLC de l'extrait aqueux.

Pics	Temps de rétention (mn)	Couleur	Activité antimicrobienne (Diamètre d'inhibition en mm)	
			SARM	UR
A1	9,89	Marron clair	12	42
A2	10,59	Marron clair	11	40
A3	12,63	Jaune clair	14	-
A4	13,67	Jaune	-	-
A5	16,96	Jaune clair	30	28
A6	17,31	Non coloré	14	22
A7	18,55	Non coloré	22	14
A8	23,13	Non coloré	22	14
A9	27,57	Non coloré	-	-

(-) = pas d'activité. Les valeurs des diamètres d'inhibition comprennent le diamètre du puits (7 mm).

La première injection en HPLC de l'extrait aqueux a révélé une très bonne activité antibactérienne et antifongique. Cette première injection a été répétée jusqu'à épuisement de l'extrait aqueux afin de récolter chaque pic actif séparément en quantité suffisante pour les études de caractérisation.

La purification finale s'est poursuivie pour les pics A1 et A5 les plus actifs. Le pic A1 pour sa forte activité antifongique (42 mm), et le pic A5 pour sa forte activité contre SARM (30 mm). De ce fait, des réinjections successives (Figures 40, 41 et 42) de chacun des deux pics sont réalisées jusqu'à purification finale.

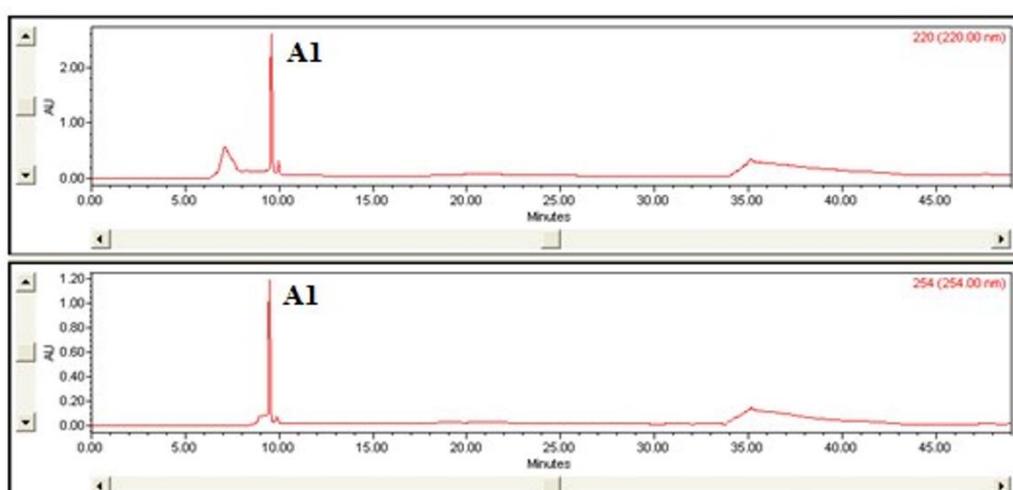


Figure 40. Profil d'élution de la deuxième injection du pic A1.

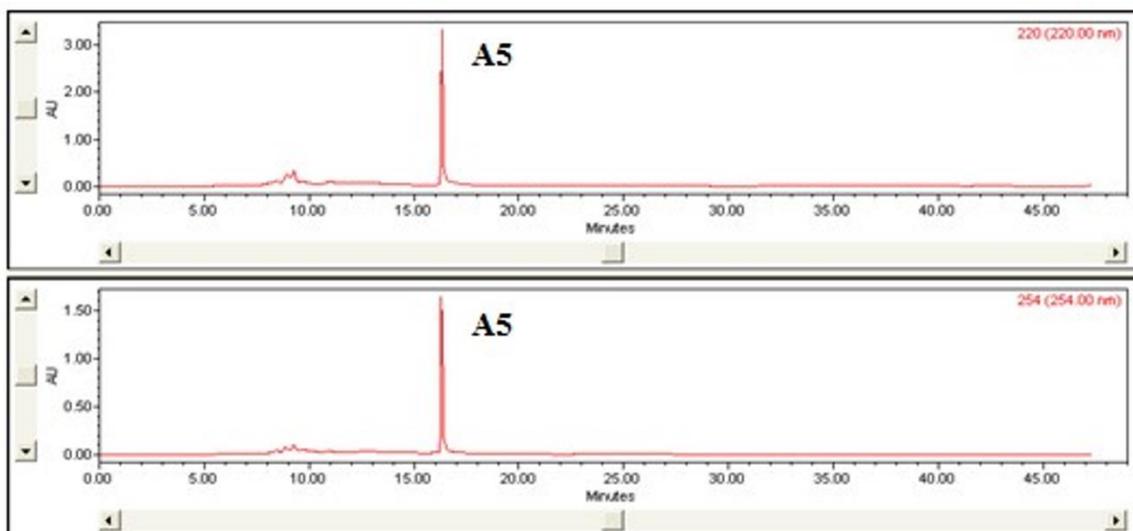


Figure 41. Profil d'éluion de la deuxième injection du pic actif A5.

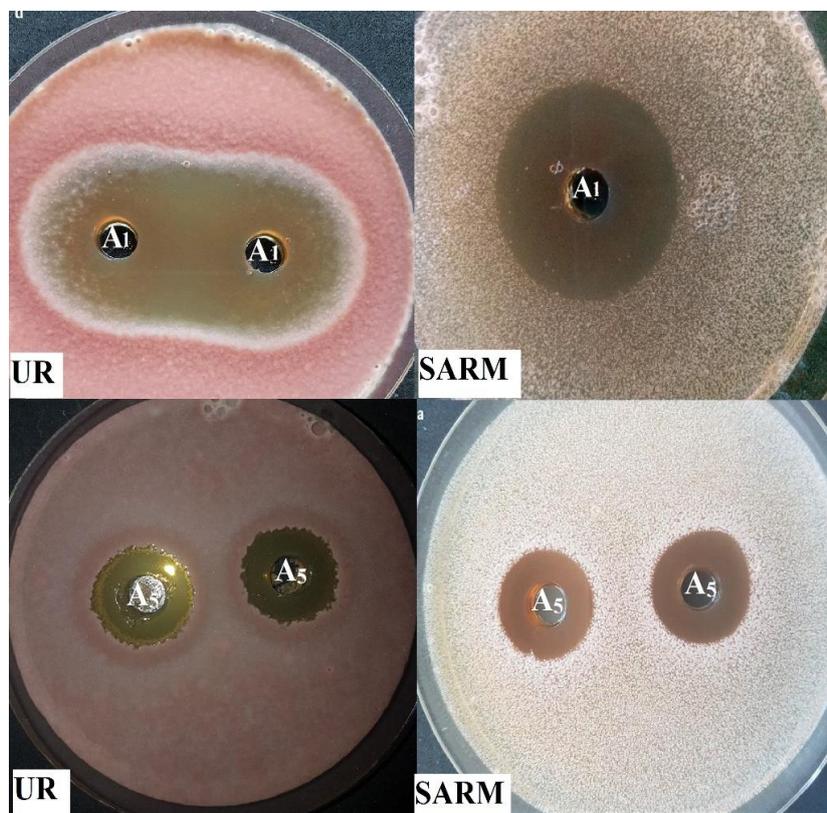


Figure 42. Tests antibiogramme des pics A1 et A5 purifiés après réinjections successives en HPLC contre *U. ramanniana* NRRL 1829 (à gauche) et *S. aureus* SARM 639c (à droite).

3.3. Discussion

La souche *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 sécrète plusieurs antibiotiques ; ceux extraits par le dichlorométhane (non colorés ou de couleur jaune clair) et ceux de la phase aqueuse. Dans l'extrait organique brut, 8 pics sont faiblement actifs. La première injection en HPLC de l'extrait aqueux révèle la présence de 7 pics actifs (non colorés, de couleur jaune ou marron clair). La présence d'une forte activité dans l'extrait aqueux suggère un caractère hydrophile des antibiotiques produits par la souche SA198. Bien que l'extrait organique soit faiblement actif, l'extraction au dichlorométhane est apparue nécessaire, car elle a permis l'élimination des impuretés, facilitant ainsi la purification par HPLC de l'extrait aqueux.

La purification a été poursuivie jusqu'à l'état pur pour les deux pics A1 et A5 et ce, en vue d'une caractérisation spectroscopique de ces antibiotiques.

Les autres pics actifs (A2, A3, A6, A7 et A8) ont également retenu notre intérêt. Néanmoins, nous avons rencontré de grandes difficultés à pouvoir les purifier (agrégation des produits due à la présence de sels empêchant la séparation des composés). Il faudrait envisager d'autres méthodes de traitement de l'échantillon aqueux et de purification (semi-purifications antérieures à l'HPLC) pour ces composés.

Nos résultats sont inédits par rapport aux précédents travaux consacrés à cette même souche, notamment ceux de [Boubetra \(2013\)](#) et [Boubetra et al. \(2013b\)](#) ayant conduit à caractériser trois nouveaux antibiotiques à partir de l'extrait organique d'une culture sur le milieu complexe ISP2. Dans ces travaux, la phase aqueuse avait été écartée du fait d'une faible activité. Dans le cas du travail de [Laassami \(2015\)](#) portant sur la même souche SA198, une production dans le milieu semi-synthétique supplémenté en CSL et en saccharose (non optimisé) a montré que l'extrait organique comportait les mêmes pics obtenus que ceux du travail de [Boubetra \(2013\)](#), avec en plus, quinze nouveaux pics actifs.

Ce travail a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de la souche *Sx. tamanrassetensis* et confirme son potentiel à produire des biomolécules à caractère hydrophobe et hydrophile.

V. CARACTERISATION PARTIELLE DES ANTIBIOTIQUES

Les produits purs A1 et A5 sont caractérisés partiellement par spectrophotométrie UV-visible, spectrométrie de masse et par la RMN du proton.

1. Caractérisation par Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV-visible de pics A1 et A5 dissouts dans de l'eau ultrapure sont illustrés dans la [Figure 43](#).

Pour la molécule A1, deux maxima d'absorption sont notés à 260 et 330 nm, et pour A5 à 275 et 330 nm, suggérant ainsi la présence d'un noyau aromatique ou de groupements conjugués (doubles liaisons).

Les spectres UV-visible des antibiotiques A1 et A5 n'ont pas montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes, ce qui indique que ces molécules ne sont pas de nature polyénique ([Martin, 1979](#); [Dinya et Sztaricskai, 1986](#)).

Ce fait est important car les polyènes sont connus pour leur toxicité et leur instabilité, et sont généralement éliminés des programmes de recherche de nouveaux antifongiques.

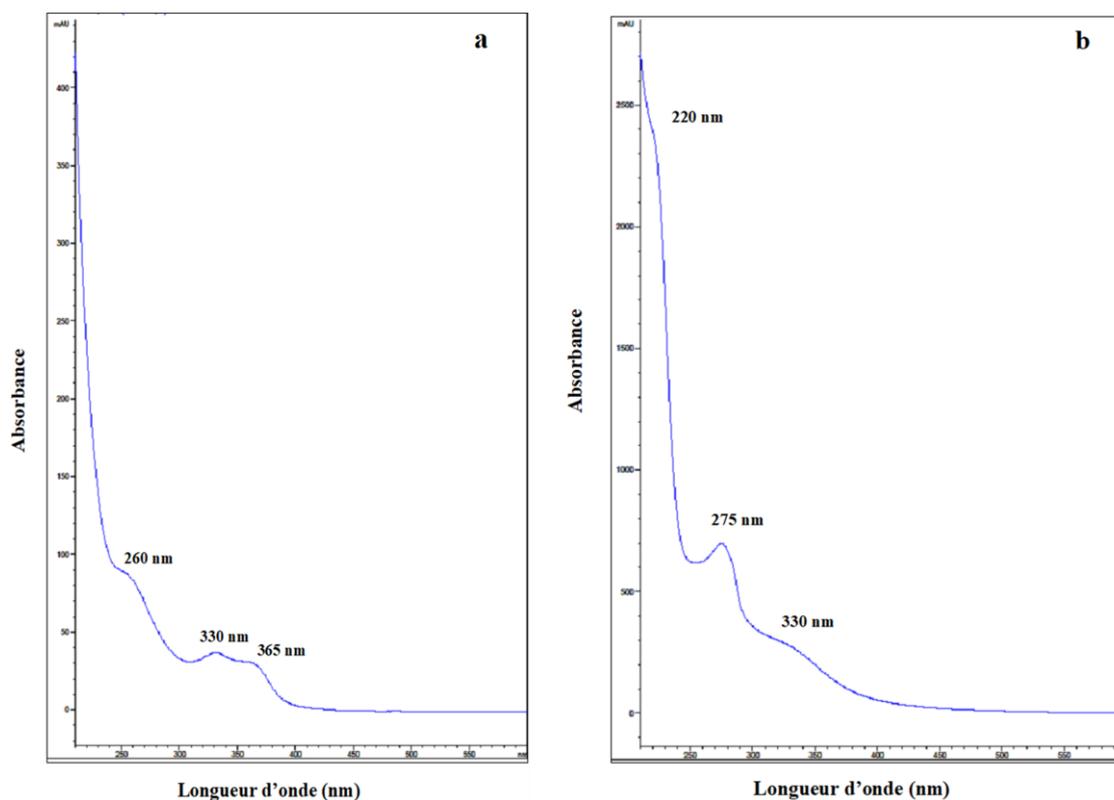


Figure 43. Spectres UV-visible d'absorption des composés A1 (a) et A5 (b) dissouts dans de l'eau ultrapure.

2. Spectrométrie de masse

L'analyse a été faite par Nano-ESI-MS (Nano-Electrospray Ionisation Masse Spectrometry), en modes positif et négatif sur les produits A1 et A5. Les spectres obtenus n'ont pas permis de déduire les masses définitives des produits, du fait que les signaux étaient trop faibles. Les deux produits semblent complexés à des sels qui obstruent la source et les capillaires et induisent l'agrégation du produit empêchant toute interprétation, et cela était le cas surtout pour le produit A1. Pour l'antibiotique A5, le spectre de masse (Figure 44) montre la présence de plusieurs ions séparés par une masse de 162 daltons et qui probablement représentent des hexoses (3 ou 4 hexoses).

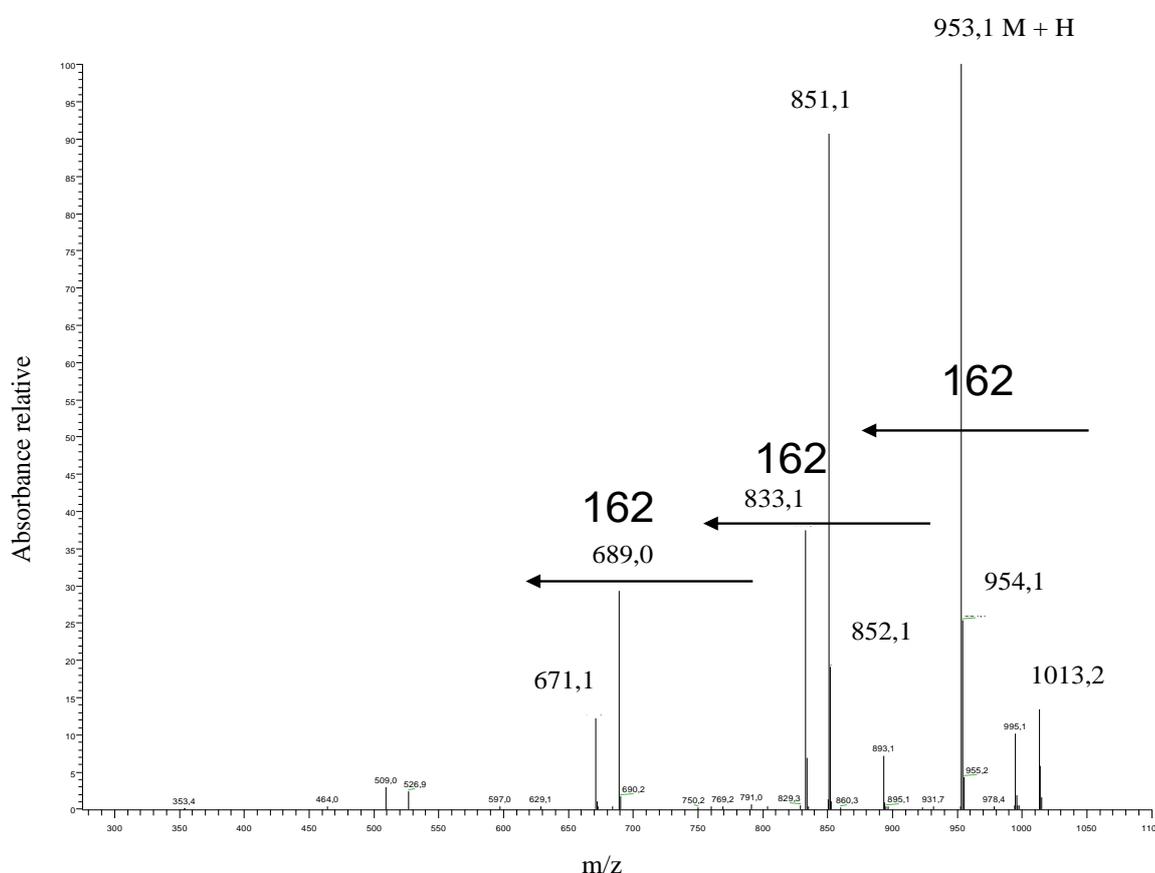


Figure 44. Spectre de masse du produit A5 produit par la souche *Saccharothrix tamanrassetensis*.

3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton a été réalisée pour les antibiotiques A1 et A5. Les spectres (Figure 45) suggèrent une ressemblance entre les deux molécules, avec cependant une structure plus complexe pour le composé A1. En effet, les données de la RMN (Figure 45 a et b) ont permis d'identifier des groupements communs entre eux. Il s'agit des déplacements chimiques enregistrés dans la région 3-4 ppm contenant un grand nombre de pics et qui traduisent une composition riche en sucres. Ainsi que des signaux compris entre 3 et 5 ppm indiquant la présence de fonctions alcools, alors que ceux entre 8 et 10 ppm sont caractéristiques de la présence de structure aromatique.

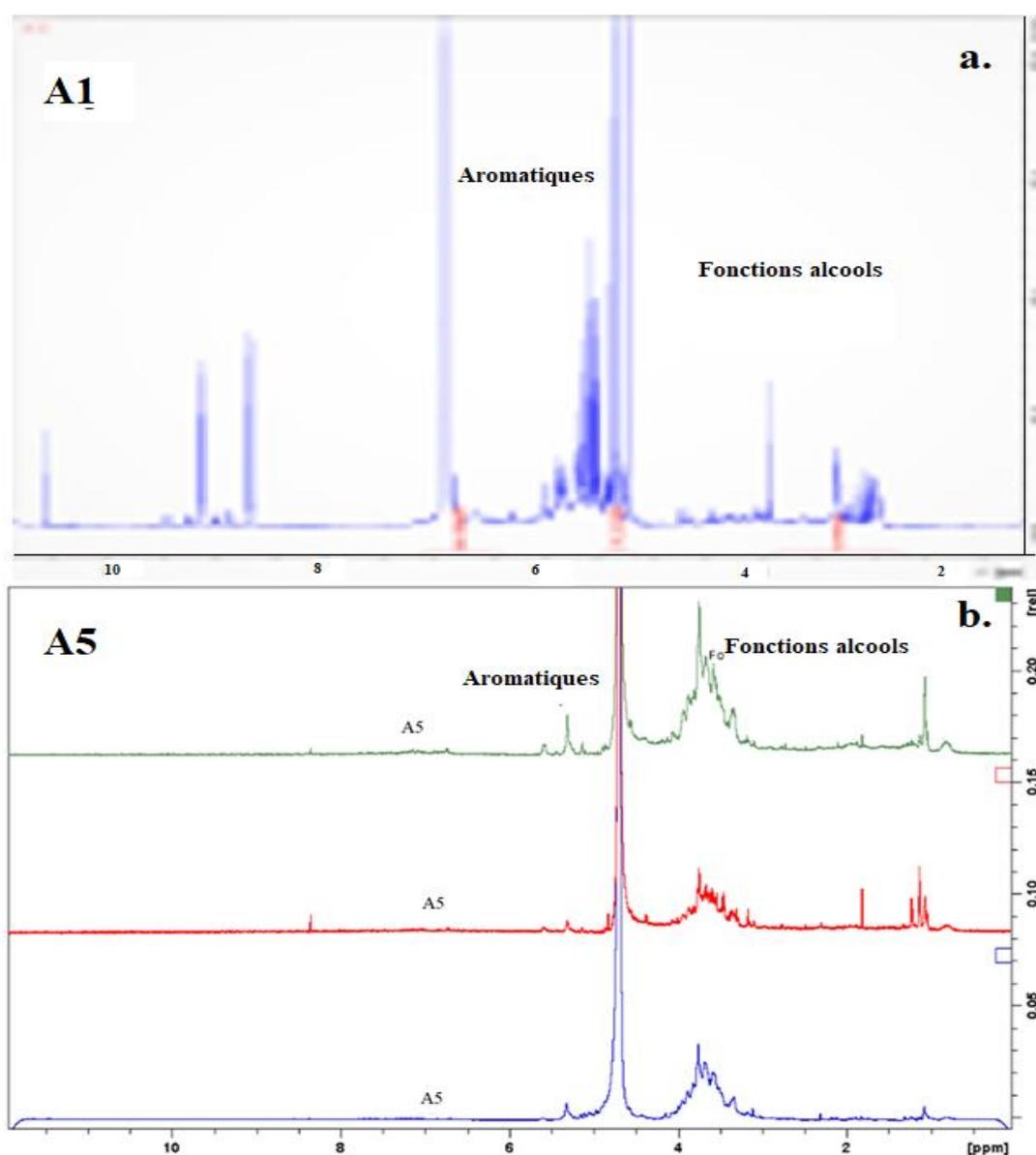


Figure 45. Spectres de RMN du proton des antibiotiques A1 (a) et A5 (b) produits par la souche *Saccharothrix tamanrassetensis*, montrant la présence d'aromatiques, d'insaturations et de fonctions alcools.

Pour la molécule A1, outre la détection de groupements alcools et d'aromatiques. Les pics enregistrés entre 6 et 7 ppm indiquent la présence d'insaturations. Le spectre (Figure 45a) a permis de parvenir à la structure d'un composé aromatique et identifié grâce à la base de données www.chemspider.com comme étant l'acide 4-hydroxyphénylacétique.

L'acide 4-hydroxyphénylacétique possède un poids moléculaire de 152 Da et a pour formule chimique $C_8H_8O_3$. Il s'agit d'un acide monocarboxylique qui représente l'acide acétique dans lequel l'un des hydrogènes du méthyle est substitué par un groupe 4-hydroxyphényle et dont la structure est illustrée dans la Figure 46. Ce composé est connu pour être sécrété par de nombreux microorganismes, plantes et animaux.

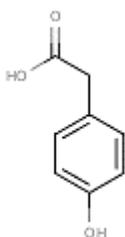


Figure 46. Structure de l'acide 4-hydroxyphénylacétique.

4. Discussion

Les résultats de la spectrophotométrie d'absorption dans l'UV couplés à ceux de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie de résonance magnétique montrent que les antibiotiques A1 et A5 ont une structure aromatique glycosylée.

De nombreuses molécules antibiotiques ayant une structure aromatique glycosylée et appartenant à diverses structures chimiques sont répertoriées dans la littérature (ouvrages, bases de données, etc.). La caractérisation de nos molécules n'est que partielle. L'identification complète de leurs structures chimiques est souhaitable, par la réalisation de la RMN du carbone 13 et des corrélations 1H-1H et 1H-13C.

Néanmoins, certaines molécules signalées dans la littérature possèdent l'acide 4-hydroxyphénylacétique dans leurs structures ainsi que des sucres, comme l'antibiotique A1. C'est le cas notamment des saccharomycines A et B produites par *Saccharothrix espanaensis* où dans une même configuration de structure c'est l'acide caféique qui se retrouve relié à une chaîne oligosidique (Strobel *et al.*, 2012). Dans une autre étude, les structures des saccharomycines A et B produites par

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

une souche de *Sx. espanaensis*, avaient été élucidées par [Kong et al. \(1998\)](#) mettant en évidence une portion importante formée d'unités osidiques.

Dans un autre travail, la souche *Saccharothrix* sp. SA 103 produit une molécule antifongique ZA02 de structure aromatique avec des sucres ([Zitouni et al., 2005](#)), comme pour le composé A5, et correspondant à un nucléoside. Les nucléosides sont généralement produits par les espèces du genre *Streptomyces*. Par ailleurs, les antibiotiques nucléosidiques produits par des espèces de *Saccharothrix* sont connus pour leur activité herbicide ([Bush et al., 1993](#)), alors que l'activité antifongique n'a été signalée jusqu'alors que dans l'étude de [Zitouni et al. \(2005\)](#).

La présence de sels complexés à des antibiotiques hydrophiles, comme pour l'antibiotique A5, et qui empêchent une interprétation correcte des spectres de masse a été rapportée par [Boudjella](#) (communication personnelle) avec des antibiotiques hydrophiles complexes produits par une souche de *Streptosporangium* (actinobactérie) et identifiés partiellement à des aminoglycosides.

Nos résultats sont très intéressants, dans la mesure où les deux antibiotiques A1 et A5 sont fortement antibactériens et antifongiques, et de nature chimique différente de celle des trois (03) caractérisés lors des travaux de [Boubetra \(2013\)](#). Ils démontrent une fois de plus la diversité des molécules produites par l'espèce *Sx. tamanrassetensis*. Il serait intéressant d'aboutir aux structures chimiques et de déterminer leurs activités biologiques.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le travail de recherche présenté dans cette thèse vise à poursuivre les travaux sur la production des antibiotiques par une nouvelle espèce d'actinobactérie *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947, isolée (Zitouni, 1995) d'un échantillon de sol de la région de Tamanrasset (désert algérien). La souche, désignée initialement *Saccharothrix* sp. SA198 a été étudiée pour la première fois d'un point de vue taxonomique et de la production d'antibiotiques par Boubetra (2013) et Boubetra *et al.* (2013a, b). Ces travaux ont permis de mettre en évidence le pouvoir producteur d'antibiotiques de la souche. En effet, elle produit dans le milieu ISP2 sept (7) antibiotiques à activités antifongique, et/ou antibactérienne. Trois (3) d'entre eux ont été déterminés d'un point de vue structure comme de nouvelles molécules. Par la suite, la souche SA198 a été identifiée à une nouvelle espèce *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 (Boubetra *et al.*, 2015).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à la souche en ayant comme objectif de poursuivre le travail sur les antibiotiques produits non encore caractérisés, et d'étudier la production dans un milieu de culture autre que l'ISP2. Le travail réalisé s'est divisé en 5 parties : (1) la recherche du pouvoir antagoniste de la souche par une méthode classique (méthode des stries croisées) et par la recherche de certains gènes de biosynthèse (méthode moléculaire) ; (2) les cinétiques de production dans un milieu de culture de base où différentes sources de carbone et d'azote sont testées; (3) l'optimisation statistique du milieu de culture de production ; (4) l'extraction et la purification des antibiotiques ; et enfin, (5) la caractérisation partielle de deux antibiotiques.

Les propriétés antagonistes de la souche *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 sont recherchées par la méthode des stries croisées sur une gamme élargie de microorganismes. Les résultats ont montré que la souche SA198 présente un large spectre d'antagonisme contre la plupart des microorganismes testés, avec notamment une bonne activité contre *Staphylococcus aureus* 639c résistant à la méticilline. Le potentiel antagoniste de la souche a été exploré également par un screening moléculaire mettant en évidence la présence des gènes NRPS et atteste du potentiel de la souche SA198 à produire une variété de métabolites secondaires bioactifs.

La production d'un antibiotique en quantité appréciable exige l'utilisation de méthodes d'optimisation. Dans cette optique, et avec une problématique de la production des antibiotiques sur un milieu autre que le milieu complexe ISP2, nous nous sommes intéressés aux facteurs nutritionnels influençant la production, à savoir les sources de carbone et d'azote dans un milieu de

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

culture de base synthétique. Cette méthode « d'optimisation classique » dite « d'un facteur à la fois » nous a permis de sélectionner les deux meilleures sources de carbone et d'azote permettant d'obtenir les meilleures activités antagonistes dirigées contre deux bactéries et un champignon. Durant ces cinétiques, les activités antibiotiques ont été mesurées par la méthode de diffusion des puits.

La première série de cinétique a permis de retenir le corn steep liquor parmi seize sources d'azotes testées (corn steep, extrait de levure, extrait de malt, peptone de caséine, caséine, sulfate d'ammonium, tryptone, L-proline, L-tyrosine, L-alanine, arginine, valine, leucine, méthionine, cystine et lysine), comme la source d'azote la plus favorable à l'activité antimicrobienne et a été utilisée pour la série de cinétique suivante. Sur les huit sources de carbone testées (glucose, dextrines, fructose, saccharose, propionate, pyruvate, succinate et acétate de sodium.), le saccharose a été le substrat carboné ayant le plus favorisé la production des activités antimicrobiennes.

Ces deux séries de cinétiques ont permis de définir un milieu de culture de production optimale à base de corn steep liquor (CSL) et de saccharose. L'utilisation du corn steep et du saccharose dans un milieu minimum a eu un effet important sur la production des antibiotiques et est à prendre en compte en considérant la place importante qu'occupe en biotechnologie l'usage de substrats carbonés et azotés peu coûteux. A cet égard, le milieu MS-CSL-saccharose développé dans ce travail, est beaucoup plus intéressant du point de vue économique par rapport au milieu ISP2.

Dans tout processus fermentaire, l'amélioration de la production est une étape cruciale notamment via l'ajustement d'un certain nombre de paramètres nutritionnels et/ou opérationnels. A ce propos, nous nous sommes également proposés dans ce travail de réaliser une optimisation statistique afin d'améliorer la production de l'activité antimicrobienne. Un protocole d'optimisation du milieu MS-CSL-saccharose reposant sur les plans d'expériences statistiques a donc été conduit. Cette démarche se trouve être différente et inédite dans notre laboratoire par rapport aux méthodologies classiques utilisées généralement. En employant, le plan de Plackett et Burman, les nutriments ; saccharose, KH_2PO_4 et corn steep liquor se sont distingués comme des éléments déterminants dans le milieu de culture pour la production antimicrobienne. Les concentrations de ces trois composés ont été testées suivant le plan d'expérience Box-Behnken et les optima calculés et déduits à partir des surfaces de réponse des ellipses générées par les représentations 2D. En utilisant les trois fonctions d'optimisation, un milieu de culture optimisé est formulé. Une

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

augmentation de l'activité antimicrobienne de 32% contre le SARM, 27% contre *B. subtilis* et 36% contre *U. ramanniana* a été validée et prouve un gain significatif de la productivité.

L'étape suivante a consisté à faire produire les antibiotiques en réacteur (en batch) dans le milieu optimisé, puis à les purifier. Contre toute attente et à l'inverse du travail de référence, après extraction à partir du filtrat de culture, l'activité antimicrobienne a été détectée dans la partie aqueuse plutôt que dans la phase organique comme il a été rapporté dans le travail de référence. Ce résultat a suscité par ailleurs un flux de questionnement et d'interrogations, particulièrement lorsque les premiers essais de purification par HPLC ne permettaient pas de retrouver un profil HPLC de l'extrait organique similaire au travail de référence et ce, dans les mêmes conditions de culture. Ce fait nouveau nous a conduits à procéder à plusieurs niveaux de vérifications de l'intégrité de la souche d'un point de vue génétique et physiologique, y compris des répétitions afin de confirmer nos résultats. Les résultats de cette vérification nous ont confortés dans l'idée d'une variation du métabolisme de la souche SA198. Cette instabilité dans la production de l'activité antimicrobienne chez cette souche avait été observée déjà dans le travail de référence, bien qu'elle ne soit pas signalée. Dans le travail de [Laassami \(2015\)](#), des problèmes de non reproductibilité des résultats de production avaient été rapportés. Vu ces nouvelles conditions de production de la souche, le travail a été réorienté vers l'étude des antibiotiques de la phase aqueuse.

La purification par HPLC de l'extrait aqueux à travers une colonne amphiphile a mis en évidence la présence de neuf pics principaux parmi lesquels, sept ont montré une activité à la fois antifongique et antibactérienne forte à très forte. Nous sommes parvenus à purifier deux molécules, A1 et A5, parmi les sept. La purification des autres molécules actives s'est avérée très difficile à cause de leur caractère hydrophile. D'autres méthodes de semi-purification sont à prévoir avant de les purifier par HPLC.

La dernière partie du travail a été consacrée à l'identification de deux antibiotiques A1 et A5 purifiés. La caractérisation de ces deux antibiotiques n'a été que partielle et a concerné la spectrométrie de masse, la résonance magnétique du proton et la spectrophotométrie UV-visible. Cette dernière analyse a permis d'écarter la possibilité d'une structure polyénique pour les deux antifongiques, ce qui est intéressant sachant que les polyènes sont évités à cause de leur toxicité et leur instabilité. Les différentes analyses de caractérisation indiquent que les deux molécules ont une structure aromatique glycosylée.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les molécules antibiotiques possédant une structure aromatique glycosylée décrites dans la littérature sont tellement nombreuses et peuvent appartenir à différentes familles (tétracyclines, anthracyclines, anthraquinones, angucyclines, etc.), qu'il est impossible de faire une comparaison avec nos antibiotiques. De ce fait, la caractérisation de nos deux antibiotiques doit se poursuivre par la réalisation de la résonance magnétique nucléaire du carbone 13, laquelle permettra de déterminer leurs structures chimiques.

Enfin, nous tenons à signaler que notre étude s'est heurtée à de grandes difficultés, depuis le début des cinétiques de production jusqu'à la purification et la caractérisation des antibiotiques. Ces problèmes propres à la souche SA198, se sont manifestés d'abord par une grande instabilité dans la production de l'activité antimicrobienne. Par la suite, d'autres problèmes sont rencontrés lors des purifications par HPLC en raison du caractère hydrophile des molécules, ce qui a affecté finalement leur caractérisation. Cependant, ce souci de reproductibilité n'est pas un cas isolé dans les processus fermentaires particulièrement avec des souches productrices sauvages et ce, même lorsque les conditions de culture sont strictement identiques. L'étude et la compréhension du comportement physiologique des microorganismes producteurs d'antibiotiques sont essentielles dans tout processus biotechnologique ambitionnant une amélioration de productivité. Elles permettent d'une part de mieux appréhender la manière dont l'initiation de la production s'opère, et d'autre part d'identifier et de résoudre les difficultés qui pourraient se manifester. Cette étude physiologique ne figurait pas parmi nos objectifs, mais pourrait faire l'objet d'un autre travail de thèse.

Il est à signaler également que la recherche de nouveaux métabolites naturels tels que les antibiotiques est une voie souvent longue, et plusieurs essais préliminaires sont souvent indispensables pour trouver les conditions optimales de production et de purification. Les résultats de ce travail donnent un aperçu général sur le potentiel producteur de la souche *Sx. tamanrassetensis* DSM 45947. Notre étude contribue aux divers travaux de recherche régulièrement dédiés à l'étude des antibiotiques sécrétés par les souches du genre *Saccharothrix*, et témoigne une fois de plus de la grande variété de molécules bioactives produites ainsi que de la diversité de leurs structures chimiques.

Le travail sur les antibiotiques de la souche est loin d'être achevé. D'autres études peuvent être envisagées afin d'approfondir nos connaissances sur cette souche. En perspective de ce travail, il serait donc intéressant de :

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

- ✓ Tester diverses sources nutritionnelles moins onéreuses, telles que les déchets de l'industrie agro-alimentaire (mélasses, farine de poisson, tourteaux de soja, son de blé...).
- ✓ Comprendre l'influence des facteurs hydrodynamiques sur la réponse physiologique de la souche *Sx. tamanrassetensis* afin d'élucider le mécanisme de déclenchement de la production de ses antibiotiques: transfert d'oxygène, morphologie, type d'agitation...
- ✓ Optimiser d'autres paramètres culturels tels que la quantité de l'inoculum, l'agitation la température, l'aération et les oligoéléments.
- ✓ Reprendre les études de purification en envisageant d'autres méthodes pour les 7 antibiotiques aqueux.
- ✓ Identifier leurs structures chimiques par les différentes méthodes spectroscopiques.
- ✓ Déterminer les concentrations minimales inhibitrices.
- ✓ Déterminer les activités biologiques autres qu'antimicrobienne, comme l'activité anti tumorale, antioxydante, anti-inflammatoire, etc.).
- ✓ Analyser le génome de la souche SA198 séquencé récemment (recherche de clusters de gènes responsables de la biosynthèse de métabolites spécialisés).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ababutain, I. (2013). Optimization of environmental and nutritional conditions to improve growth and antibiotic productions by *Streptomyces* sp. Isolated from Saudi Arabia Soil. *International Research Journal of Microbiology*. **4**: 179-187.

Abdelghani, T., (2011). Production of antibacterial metabolites by strain n^o.10/2 (*S. albovinaceus*) and media optimization studies for the maximum metabolite production. *IJPI. J. Biotech.*, **1**: 1-11

Abdel-Razek, A. S., El-Naggar, M. E., Allam, A., Morsy, O. M., Othman, S. I. (2020). Microbial natural products in drug discovery. *Processes.*, **8**(4): 470–. <https://doi.org/10.3390/pr8040470>

Abdelwahed, N., Abdallah, N. A., El-Ghawas, D. E., El-Din, S. M. B., El-Diwany, A. L. (2012). Isolation, identification and optimization of antimicrobial metabolites produced by soil derived actinomycetes. *Egypt J Exp Biol (Bot).*, **8**(2): 205–217

Abraham, E. P., Gardner, A. D., Fletcher, C. M., Gardner, A. D., Heatley, N. G., et al Chain, E. (1941). Further observations on penicillin. *Lancet.*, **238**: 177–188. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)72122-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)72122-2)

Adegboye, M. & Babalola, O. (2015). Evaluation of antibiotic biosynthetic potential of actinomycete isolates to produce antimicrobial agents. *British Microbiology Research Journal.*, **7**: 243-254. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/14627>.

Adegboye, M. & Babalola, O. (2016). Isolation and identification of potential antibiotic producing rare actinomycetes from rhizospheric soils. *Journal of Human Ecology*. **56**: 31-41. <https://doi.org/10.1080/09709274.2016.11907035>.

Adinarayana, K., Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Narayana, J. L., Raju, K. V. V. S. N. (2003). Optimization of medium and cultural conditions for neomycin production using response surface methodology. *Indian Journal of Biotechnology.*, **2**: 564-570.

Aharonowitz, Y (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annual Review of Microbiology.*, **34**(1), 209–233.

Ahmad, M. S., El-Gendy, A. O., Ahmed, R. R., Hassan, H. M., El-Kabbany, H. M., Merdash, A. G. (2017). Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp AGM12-1 isolated from Egyptian soil. *Frontiers in Microbiology.*, **8**: 438.

Ahsan, T., Chen, J., Zhao, X., Irfan, M., Wu, Y., (2017). Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. *AMB Express*, **7**(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0351-z>

Akhurst, R. J. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*. *J Gen Microbiol.*, **128**: 3061–3065

Akpan, M. R., Isemin, N. U., Udoh, A. E., Ashiru-Oredope, D. (2020). Implementation of antimicrobial stewardship programmes in African countries: a systematic literature review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.*, **S2213-7165(20)30073-4**. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.03.009>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Baarri, A. & Hayashi, M., & Ogawa, M., & Hayakawa, S. (2011).** Effects of mono- and disaccharides on the antimicrobial activity of bovine lactoperoxidase System. *Journal of food protection.*, **74**: 134-9. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-184>.
- Al-Ghazali, L. H., et Omran, R. (2017).** Optimization of medium composition for antibacterial metabolite production from *Streptomyces* sp. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.*, **10**(9): 381. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i9.19813>
- Al-Sarrani, A. Q., & El-Naggar, Y. M. (2006).** Application of plackett-Burman factorial design to improve citrinin production in *Monascus rubber* batch cultures. *Botanical Studies* **47**: 167-174.
- Amin, D. H., Abolmaaty, A., Tolba, S., Abdallah, N. A., Wellington, E. M. (2017a).** Phylogenic characteristics of a unique antagonistic *Micromonospora* sp. Rc5 to *S. aureus* isolated from Sinai Desert of Egypt. *Curr Res Microbiol Biotechnol.*, **5**(6): 1295–1306
- Amin, D. H., Tolba, S., Abolmaaty, A., Abdallah, N. A., Wellington, E. M. (2017b).** Phylogenetic and antimicrobial characteristics of a novel *Streptomyces* sp. Ru87 isolated from Egyptian soil. *Int J Curr Microbiol App Sci.*, **6**(8): 2524–2541
- Amin, D. H., Abolmaaty, A., Tolba, S., Abdallah, N. A., Wellington, E. M. (2018).** Phylogenic characteristics of a unique antagonistic *Micromonospora* sp. Rc5 to *S. aureus* isolated from Sinai Desert of Egypt. *Ann Res Rev Biol.*, **9**: 1–15
- Amin, D. H., Abolmaaty, A., Borsetto, C. et al (2019).** In silico genomic mining reveals unexplored bioactive potential of rare actinobacteria isolated from Egyptian soil. *Bull Natl Res Cent.*, **43**: 78. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0121-y>
- Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., & Wellington, E. M. H. (2020).** Microbiological and molecular insights on rare *Actinobacteria* harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre.*, **44**(1).
- Aminov, R. I. (2010).** A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology.*, **1**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>.
- Antonio, A. da S., Wiedemann, L. S. M., Veiga-Junior, V. F. (2020).** Natural products' role against COVID-19. *RSC Advances.*, **10**(39):23379–23393. <https://doi.org/10.1039/D0RA03774E>
- Aouiche, A., Sabaou, N., Meklat, A., Zitouni, A., Bijani, C., Mathieu, F. and Lebrihi, A. (2012).** *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **28** : 943-951.
- Aouiche, A. (2013).** Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigène pour l'Homme. Thèse de doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba. 159 p.
- Aouiche, A., Meklat, A., Bijani, C., Zitouni, A., Sabaou, N. and Mathieu, F. (2015).** Production of vineomycin A1 and chaetoglobosin A by *Streptomyces* sp. PAL114. *Ann. Microbiol.* **65**: 1351-1359.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amoutzias, G. D., van de Peer Y., Mossialos D. (2008).** Evolution and taxonomic distribution of nonribosomal peptide and polyketide synthases. *Future Microbiol.*, **3**: 361–370. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.3.361>.
- Arasu, M.V., Rejiniemon, T. S., Al-Dhabi, N. A., Duraipandiyar, V., Ignacimuthu, S, Agastian, P., Kim, S., Huxley, A. J., Lee, K. D., Choi, K. C. (2014).** Nutritional requirements for the production of antimicrobial metabolites from *Streptomyces*. *African. J. Microbio. Research.*, **8**: 750-758
- Arul Jose, P., Sivakala, K.K., Jebakumar, S.R.D., (2013).** Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06. *Int. J. Microbiol.* **2013**: 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/526260>
- Atlas R. M. (2005).** Handbook of media for environmental microbiology. Second edition. *CRC Press* is an imprint of Taylor & Francis Group.
- Ayuso-Sacido, A., Genilloud, O. (2005).** New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol.* **49**(1): 10-24
- Azma, M., Mohamed, M. S., Mohamad, R., Rahim, R. A., Ariff, A. B. (2011).** Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochem Eng J.*, **53**(2): 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.10.010>
- Azman, A.S., Othman I., Velu, S.S., Chan, K.G., Lee, L.H. (2015).** Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Frontiers in Microbiology.*, **6**: 856.
- Babadi, Z. K., Sudarman, E., Ebrahimipour, G. H., Primahana, G., Stadler, M., & Wink, J. (2019).** Structurally diverse metabolites from the rare actinobacterium *Saccharothrix xinjiangensis*. *The Journal of Antibiotics.*, **73**: 48–55. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0223-7>
- Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. & Sabaou, N. (2005).** Activité antifongique d’une souche d’*Actinomadura* d’origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J. Mycol. Médicale*, **15**: 211–219.
- Badji, B. (2006).** Étude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d’actinomycètes d’origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p.
- Badji, B, Zitouni, A, Lebrihi, A, Le Faou, Al., Sabaou, N. (2009).** Molécules bioactives sécrétées par *Nonomuraea* sp. NM94 (*Actinomycetales*) d’origine saharienne. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 25-36.
- Baker, W., van den Broek, A., Camon, E., Hingamp, P., Sterk, P., Stoesser, G., Tuli, M. A. (2000).** The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 19–2
- Bakour, L. (2006).** Caractérisation chimique de nouvelles mutactimycines synthétisées par *Saccharothrix* sp. SA103 et influence des sources de carbone et d’azote sur la production. Mémoire de Magister en Microbiologie. Faculté des sciences de la nature et de la vie de Bejaia. 76p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baltz, R. H., Brian, P., Miao, V., Wrigley, S. K. (2006).** Combinatorial biosynthesis of lipopeptide antibiotics in *Streptomyces roseosporus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**(2): 66–74.
- Baltz, R., H. (2017).** Molecular beacons to identify gifted microbes for genome mining. *The Journal of Antibiotics.*, **70**(5): 639–646. <https://doi.org/10.38/ja.2017.1>
- Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, Kh., Beaulieu, C. (2002).** Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.*, **18**(1): 49–54. <https://doi.org/10.1023/a:1013966407890>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., et al. (2016).** Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**: 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Bartlett, J., G., Gilbert, D., N., Spellberg, B. (2013).** Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis.*, **56**(10): 1445–1450.
- Bashir, Zidan., Abduldiem, et al (2012).** Factors affecting bioactivity of secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. PT1 using Plackett-Burman design. *Advances in Environmental Biology.*, c, p. 3043.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. and Turck, M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **36**: 493–496.
- Bawazir, M. A. and Shantaram, M. (2018).** Ecology and distribution of actinomycetes in nature—a review. *International Journal of Current Research.*, **10**(7): 71664–71668,
- Belghit, S., Driche, E., H., Bijani, C., Zitouni, A., Sabaou, N., Badji, B., & Mathieu, F. (2016).** Activity of 2,4-Di-tert-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *Journal de Mycologie Médicale.*, **26**(2) : 160–169.
- Belkacem, A. (2012).** Evaluation de la production d'antibiotiques antifongiques par une souche saharienne de *Streptomyces (Actinomycetale)* dans différents milieux de culture. Mémoire Master. Faculté des sciences agrovétérinaires et biologiques. Blida.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., Ahmane, Z. (2018).** Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University - Science.*, S1018-3647(17)31369-1 <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.008>
- Benoist, D., Tourbier, Y., Germain-Tourbier, S. (1994).** Plans d'expériences : construction et analyse. Edition : Technique & Documentation-Lavoisier.paris:32p.
- Benslimane, C. (1996).** Etude physiologique de *Streptomyces ambofaciens* producteur de la spiramycine en milieu complexe. Effet de la source de carbone sur la consommation des acides aminés et des acylglycérols. Thèse de Doctorat, INPL-ENSAIA. Nancy, France. 199p.
- Benzohra, I, E., Megateli, M., Berdja, R. (2015).** Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management. *Afr J Biotechnol.*, **14**: 542-550. <https://doi.org/10.5897/AJBX2014.14292>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bérdy, J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics.*, **58** (1): 1-26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008).** Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.*, **76** : 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bezerra, M. A., Ferreira, S. L. C., Novaes, C. G., dos Santos, A. M. P., Valasques, G. S., da Mata Cerqueira, U. M., & dos Santos Alves, J. P. (2018).** Simultaneous optimization of multiple responses and its application in analytical chemistry – A review. *Talanta.*, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.088>
- Bibb, M. J. (2005).** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**: 208–215
- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., Stahelin, H. (1976).** Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions.*, **6**(4): 468–475.
- Borenstajn, D., Wolf, J. (1955).** Production of oxytetracycline in laboratory and pilot plant conditions. *Med Dosw Mikrobiol.*, **7**(2): 135-154
- Boubetra, D. (2013).** Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198 Thèse de Doctorat. École Nationale Supérieure Agronomique, El-Harrach, Alger. 154 p.
- Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P. C., Klenk, H. P., Sabaou, N. (2013a).** *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **63**: 549–553
- Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., Mathieu, F. (2013b).** Taxonomy and chemical characterisation of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res.*, **168** : 223–230
- Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Sproer, C., Klenk, H. P. & Sabaou, N. (2013c).** *Saccharothrix saharensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**: 3744–3749.
- Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H. P., Sabaou, N. (2015).** *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **65** : 1316–1320
- Boudjella, H. (2007).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger. 188 p.
- Boudjella, H., Zitouni, A., Coppel, Y., Mathieu, F., Monje, M. C., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2010).** Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *J Antibiot. (Tokyo).*, **63**: 709-711 <https://doi.org/10.1038/ja.2010.111>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boulkour, S. (2016).** Étude de la production des protéases et d'antibiotiques par une souche de *Streptomyces* sp. Isolée d'un sol de la Mitidja (Algérie). Thèse de doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba. 229 p.
- Bouras, N. (2005).** Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat. École nationale supérieure agronomique. Toulouse. 238p.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2006a).** Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J. Appl. Microbiol.*, **100**: 390–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02762.x>.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2006b).** Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolones antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enz. & Microb. Tech.*, **39**: 1423-429.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2007).** Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem.*, **42**: 925-933 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.007>
- Bouras, N., Merrouche, R., Lamari, L., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2008).** Recursor directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem.*, **43**: 1244-1252.
- Bouras, N., Meklat, A., Toumatia, O., Mokrane, S., Holtz, M. D., Strelkov, S., Sabaou, N. (2013).** Bioactive potential of a new strain of *Streptomyces* sp. PP14 isolated from Canadian soil. *African Journal of Microbiology Research*, **7**(25): 1
- Bouras, N., Meklat, A., Zitouni, A., Mathieu, F., Schumann, P., Spröer, C., Sabaou, N. and Klenk, H. P. (2015a).** *Nocardiopsis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **107**(2): 313–320. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0329-7>.
- Bouras, N., Mokrane, S., Bouras, H. D., Kemassi, A., Cédric, B., Lebrihi, A., Mathieu, F., Sabaou N. (2015b).** Etude cinétique de la croissance de *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 en fermenteur batch sur un milieu semi synthétique en présence d'acide tiglique et d'acide méthacrylique. *ELWAHAT.*, **8** (1) : 19-35.
- Bouznada, K., Bouras, N., Mokrane, S., Chabane Chaouch, F., Zitouni, A., Pötter, G., Spröer, C., Klenk, H. P., Sabaou, N. (2016b).** *Saccharothrix isguensis* sp. nov, an actinobacterium isolated from desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **66**: 4785–4790
- Bouznada, K., Bouras, N., Mokrane, S., Chabane Chaouch, F., Zitouni, A., Pötter, G., Spröer, C., Klenk, H. P., Sabaou, N. (2017).** *Saccharothrix ghardaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, **110**: 399–405
- Bouznada, K., (2018).** *Saccharothrix* et genres apparentés des sols de la région du M'zab: isolement, taxonomie, mise en évidence de nouvelles espèces et production d'antibiotiques contre

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

divers microorganismes pathogènes. Thèse de doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba. 252 p.

Box, G. E. P.; Behnken, D. W. (1960). Simplex-sum designs: a class of second order rotatable designs derivable from those of first order. *The Annals of Mathematical Statistics.*, **31**(4): 838–864. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177705661>

Box, G. E. P., Hunter, W. G., Hunter, J. S. (1978). *Statistics for Experimenters*. New York: Wiley.

Box, G.E.P. et Draper Norman, R. (1987) *Empirical model-building and response surfaces*, Ed. John Wiley & Sons, Inc.

Box, G.E.P., hunter, W. G., hunter, J. S. (2005). *Statistics for Experimenters*, deuxième édition. John Wiley and Sons. New-York. 633 pages.

Brady, S. F., Simmons, L., Kim, J.H., Schmidt, E. W. (2009). Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms. *Nat. Prod. Rep.*, **26**: 1488–1503.

Braznikova, M. G., Konstantinova, N.V., Potapova, N. P. and Tolstykh, I. V. (1977). Physicochemical characteristics of the new antineoplastic antibiotic, nocamycin. *Antibiotiki*, **22**, 486-489.

Brown, S. D. (2017). The chemometrics revolution re-examined. *Journal of Chemometrics.*, **31**(1): 1-23. <https://doi.org/10.1002/cem.2856>

Buchanan, R., L. and Stahl, H., G. (1984). Ability of various carbon sources to induce and support aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. *J Food Saf.*, **6**: 271–279.

Bull, A. T. and Stach, J. E. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.*, **15**: 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.004>

Bush, B. D., Fitchett, G. V., Gates, D. A., & Langley, D. (1993). Carbocyclic nucleosides from a species of *Saccharothrix*. *Phytochemistry.*, **32**(3): 737–739. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)95163-](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)95163-)

Büchs, J., Lotter, S., Milbradt, C. (2001). Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem Eng J*, **7**:135-141.

Busi, S., Pattnaik, S. S. (2018). Current status and applications of actinobacteria in the production of anticancerous compounds. In *new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*; 1st ed.; Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 137–153. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00009-6>.

Callao, M. P. (2014). Multivariate experimental design in environmental analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **62**: 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.009>

Chaabane Chaouch, F., Bouras, N., Mokrane, S., Zitouni, A., Schumann, P., Spröer, C., Sabaou, N. & Klenk, H.-P. (2016a). *Streptosporangium becharensense* sp. nov., an actinobacterium isolated from desert soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66**: 2484–2490.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chaabane Chaouch, F., Bouras, N., Mokrane, S., Zitouni, A., Schumann, P., Spröer, C., Sabaou, N. & Klenk, H.-P. (2016b).** *Streptosporangium saharense* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66**: 1371–1376.
- Chaabane Chaouch, F., Bouras, N., Mokrane, S., Bouznada, K., Zitouni, A., Pötter, G., Spröer, C., Klenk, H. P. and Sabaou, N. (2017).** *Planomonospora algeriensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from a Saharan soil of Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **110**(2): 245–252. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0795-1>.
- Chain, E., Florey, H. W., Gardner, N. G., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., et al. (1940).** Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet.*, **236**: 226–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)08728-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)08728-1)
- Challis, G. L. (2005).** A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Bio Chem.*, **6**(4): 601–611. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400283>
- Chambers, H. F. (2005).** Community-associated MRSA — Resistance and virulence converge. *New England Journal of Medicine.*, **352**(14): 1485–1487. <https://doi.org/10.1056/nejme058023>
- Chapman, T. M., Perry, C. M. (2003).** Cefepime: a review of its use in the management of hospitalized patients with pneumonia. *Am J Respir Med.*, **2**(1):75-107. <https://doi.org/10.1007/BF03256641>.
- Chakrabarti, S., Chandra, A. L. (1982).** A new streptomycete and a new polyene antibiotic, acmycin. *Folia Microbiol (Praha).*, **27**(3):167-72. <https://doi.org/10.1007/BF02877395>.
- Chaudhary, H., Gopalan, N., Shrivastava, A., Singh, S., Singh, A. and Yadav, J. (2013).** Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.*, **4**(2): 118. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.111528>.
- Chen, G., Maxwell, P., Dunphy, G. B., Webster, J. M. (1996).** Culture conditions for *Xenorhabdus* and symbionts of entomopathogenic nematodes. *Nematologica.*, **42**: 124–127.
- Chen, Q., He, G., & Ali, M. A. (2002).** Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology.*, **30**(5), 667–672.
- Chen, X., Xu, F., Qin, W., Ma, L., & Zheng, Y. (2012).** Optimization of enzymatic clarification of green asparagus juice using response surface methodology. *Journal of Food Science.*, **77**(6), C665–C670
- Chen J, Liu D, Shi B, Wang H, Cheng Y, Zhang W. (2013).** Optimization of hydrolysis conditions for the production of glucomanno-oligosaccharides from konjac using β -mannanase by response surface methodology. *Carbohydr Polym.*, **1**;93(1): 81-8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cho, S.S., Choi, Y.H., Simkhada, J.R., Mander, P., Park, D.J and Yoo, J.C. (2012).** - A newly isolated *Streptomyces* sp. CS392 producing three antimicrobial compounds. *Bioprocess Biosyst Eng.*, **35**, 247-254.
- Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., & Prat, M., D. (2009).** Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*, **395**(4): 877–891.
- Dalhoff, A. (2018).** Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.*, **13**: 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.024>
- Da Rocha, M. E. B., Freire, F. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., Rondina, D. (2014).** Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control.*, **36**: 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- Dasu, V. V. and Panda, T. (2000).** Optimization of microbiological parameters for enhanced griseofulvin production using response surface methodology. *Bioprocess Eng.*, **22**: 45-49
- Davidson, P.M., Sofos, J.N., & Branen, A.L. (Eds.). (2005).** Antimicrobials in Food (3rd ed.). *CRC Press.*, 720 p. <https://doi.org/10.1201/9781420028737>
- Davies, J. (1999).** Millennium bugs. *Trends Biochem Sci.*, **24**: M2–M5.
- Delaunay, S., Rondags, E. et Germain, P. (2003).** Production d’antibiotiques par biotechnologies. Techniques de l’ingénieur. Opérations unitaires. génie de la réaction chimique J6008(1-12).
- De Azeredo, L. A. I., De Lima, M. B., Coelho, R. R. R. & Freire, D. M. G. (2006).** A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. *Current Microbiology.*, **53**(4): 335–339. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0163-x>
- Demain, A. L. (1989).** Carbon source regulation of idiolite biosynthesis. in Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes. (ed. Shapiro, S.) 127–134 (CRC Press, Boca Raton, FL).
- Demain, A. L., Adrio, J. L. (2008).** Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol.*, **38**: 41–55
- Demain, A. L. and Sanchez, S. (2009).** Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* **62**: 5–16. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>
- Dhakal, D., Pokhrel, A. R., Shrestha, B., Sohng, J., K. (2017).** Marine rare actinobacteria: isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Front Microbiol.*, **8**: 1106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01106>
- Djinni, I., Djoudi, W., Souagui, S., Rabia, F., Rahmouni, S., Mancini, I., Kecha, M. (2018).** *Streptomyces thermoviolaceus* SRC3 strain as a novel source of the antibiotic adjuvant streptazolin: A statistical approach toward the optimized production. *J. Microbiol. Meth.*, **148**: 161–168.
- Djinni, I., Defant, A., Kecha, M., and Mancini, I., (2019).** Actinobacteria derived from algerian ecosystems as a prominent source of antimicrobial molecules. *Antibiotics*, **8**(4): 172. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040172>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ding, T., Yang, L. J., Zhang, W. D., & Shen, Y. H. (2019).** The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity. *RSC Advances.*, **9**(38): 21964–21988. <https://doi.org/10.1039/c9ra03579f>
- Dilip, C. V, Mulaje, S. S., Mohalkar, R. Y. (2013).** A review on Actinomycetes and their biotechnological application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.*, **4**(5): 1730-1742.
- Dinya, Z.M., Sztaricskai, F.J. (1986).** Ultraviolet and light absorption spectrometry. In: Modern analysis of antibiotics. Aszalos A. (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 19-96.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M., Puglia, A–M. (2002).** Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J Biotechnol.*, **99**: 187–198.
- Dreyfuss, M., Harri, E., Hoffmann, H., Kobel, H., Pache, W., Tschertter, H., (1976).** Cyclosporin A and C. New metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **3** : 125–133.
- Driche, E. H., Sabaou, N., Bijani, C., Zitouni, A., Pont, F., Mathieu, F., Badji, B. (2017).** *Streptomyces* sp. AT37 isolated from a Saharan soil produces a furanone derivative active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *World J Microbiol Biotechnol.* **33**: 105. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2265-y>
- Droesbeke, J. J., Fine, J., Saportag, G. (1997).** Plans d'expériences - Applications à l'entreprise. Association pour la statistique et ses utilisations (France), Société de statistique de France Editions TECHNIP, 1997 - 509 pages
- Drouin, J. F. (1996).** Analyse d'image en biotechnologie. quantification de la morphologie de microorganismes filamenteux au cours de fermentations et suivi de la croissance de cellules animales sur microporteurs au cours de culture. Thèse de Doctorat, ENSALA INPL, Nancy, France.
- Dutta, D., & Das, M. D. (2017).** Optimization and partial characterization of intracellular anticandidal protein from *Aspergillus giganteus* MTCC 8408 using taguchi DOE. *Bioengineered.*, **8**(5): 536-548. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1264539>
- Eccleston, G. P., Brooks, P. R. & Kurtböke, D. I. (2008).** The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the Sunshine Coast in Australia. *Marine drugs.*, **6**(2): 243–261. <https://doi.org/10.3390/md20>
- El-Enshasy, H. A., Mohamed, N. A., Farid, M. A., El Diwany, A. A. (2008).** Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresource. Technol.*, **99**: 4263-4268.
- Eichenberger, E. M., & Thaden, J. T. (2019).** Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, **8**(2): 37. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020037>
- El Modafar, C. (2010).** Mechanisms of date palm resistance to bayoud disease: current state of knowledge and research prospects. *Physiol Mol Plant Pathol* **74**: 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.06.008>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- El-Naggar, N., Saber, W. I. A., El-Hersh E. S M. and. El-Khateeb, A. Y (2015).** An innovative synergism between *Aspergillus Oryzae* and *Azotobacter Chroococcum* for bioconversion of cellulosic biomass into organic acids under restricted nutritional conditions using multi-response surface optimization. *Biotechnology*. **14**: 47-57.
- El-Saied, H., Basta, A., Gobran, R. (2004).** Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application). polymer-plastics technology and engineering - *POLYM-PLAST TECHNOL ENG.*, **43**. 797-820.
- El-Sheekh, M. M., Khairy, H. M., Gheda, S. F., & El-Shenody, R. A. (2016).** Application of Plackett–Burman design for the high production of some valuable metabolites in marine alga *Nannochloropsis oculata*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research.*, **42**(1): 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.10.001>
- Elibol, M. (2004).** Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology. *Process Biochem.*, **39**: 1057-1062
- Escalante, L., Ramos, I., Imriskova, I. et al. (1999).** Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius* . *Appl Microbiol Biotechnol.*, **52**, 572–578 <https://doi.org/10.1007/s002530051562>.
- Escalante-Chong, Renan; Savir, Yonatan; Carroll, Sean M.; Ingraham, John B.; Wang, Jue; Marx, Christopher J.; Springer, Michael (2015).** Galactose metabolic genes in yeast respond to a ratio of galactose and glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(5): 1636–1641. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418058112>
- EUCAST. (2018).** European committee on antimicrobial susceptibility Testing. www.eucast.org Site Web visited in November 2018.
- Felnagle, E. A., Rondon, M. R., Berti, A. D., Crosby, H. A., Thomas, M. G., (2007).** Identification of the biosynthetic gene cluster and an additional gene for resistance to the antituberculosis drug capreomycin. *Appl Environ Microbiol.*, **73**(13) : 4162–70.
- Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., et al. (2008).** Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Mol Pharm.*, **5**(2): 191–211. <https://doi.org/10.1021/mp700137g>
- Feng, J., Zhang, W., Han, L., Zhang, X. (2011).** Statistical optimization of medium components to improve the antibiotic activity of *Streptomyces* sp 19G-317. *African journal of agricultural research*. **6**: 4424-4431.
- Fenical, W., Jensen, P. R. (2006).** Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol*, **2**, pp. 666-673.
- Ferreira, S. L. C., Silva, Junior., Mario, M., Felix, C. S. A., da Silva, D. L. F., Santos, A. S., Santos Neto. J. H., de Souza, C. T., Cruz, Junior. R. A., Souza, A. S. (2017).** Multivariate optimization techniques in food analysis - A review, *Food Chemistry.*, **273**: 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.114>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ferreira, S. L. C., Lemos, V. A., de Carvalho, V. S., da Silva, E. G. P., Queiroz, A. F. S., Felix, C. S. A., Oliveira, R. V. (2018).** Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchemical Journal.*, **140**: 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.002>
- Fleming, A. (1929).** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology.*, **10**(3): 226–236.
- Fowler, V. G., Boucher, H. W., Corey, G. R., Abrutyn, E., Karchmer, A. W., Rupp, M. E., & al. (2006).** Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.*, **355**(7): 653–665. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa053783>
- Frey, D. D., Engelhardt, F., & Greitzer, E. M. (2003).** A role for “one-factor-at-a-time” experimentation in parameter design. *Research in Engineering Design.*, **14**(2): 65–74. <https://doi.org/10.1007/s00163-002-0026-9>
- Galinier, A. (2018).** La répression catabolique ou comment les bactéries choisissent leurs sucres préférés. *Médecine/sciences.*, **34**(6-7) : 531–539. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183406012>
- Galo, M., Katz, E. (1972).** Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.*, **109**(2): 659–667.
- Gan, M., Liu, B., Tan, Y., Wang, Q., Zhou, H., He, H., Xiao, C. (2015).** Saccharothrixones A–D, tetracenomycin-type polyketides from the marine-derived actinomycete *Saccharothrix* sp. 10-10. *Journal of Natural Products.*, **78**(9): 2260–2265. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00577>
- Gao, H., Liu, M., Liu, J., Dai, H., Zhou, X., Liu, X., Zhou, Y., Zhang, W., Zhang, L. (2009).** Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource. Technol.*, **100**(17): 4012–4016.
- Garcia-DIAZ, A, Phillips, D. T. (1995).** Principles of experimental design and analysis. Ed. Chapman & Hall
- Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Rubén Tormo, J., Vicente, F. (2011).** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, **38**(3), 375–389. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0882-7>
- Genilloud, O. (2012).** Current challenges in the discovery of novel antibacterial from microbial natural products. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, **7**(3): 189–204. <https://doi.org/10.2174/157489112803521968>.
- Genilloud, O. (2014).** The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **106**(1): 173–88. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0204-6>.
- Genilloud, O. (2017a).** Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. *Nat. Prod. Rep.*, **34**: 1203–1232.
- Genilloud, O. (2017b).** Physiology of Actinobacteria. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*, (Chapter 7): 151–180. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1_7
- Genilloud, O. (2018).** Mining actinomycetes for novel antibiotics in the omics era: are we ready to exploit this new paradigm? *Antibiotics.*, **7**(4): 85

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Genilloud, O. (2019).** Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Current Opinion in Microbiology.*, **5**: 81–87.
- Gonzalez, J. B., Fernandez, F. J., and Tomasini, A. (2003).** Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian J. Biotechnol.* **2**: 322–333.
- Gordon, R. J., & Lowy, F. D. (2008).** Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases.*, **46**(S5): S350–S359. <https://doi.org/10.1086/533591>
- Goupy, J. (1999).** Plans d'expériences pour surfaces de réponse. Dunod. Paris. 409 pages. ISBN 2 10 003993 8.
- Goupy, J. (2005).** Pratiquer les Plans d'Expériences. Dunod. Paris. 560 pages.
- Goupy, J. (2006).** Les Plans d'expériences. Edition : Revue MODULAD.
- Gunda, M. M. and Charya, M.A. S. (2013).** Physiological factors influencing the production of antibacterial substance by fresh water *Actinobacteria*. *J. Recent. Advances. Applied Sciences.*, **28**: 55-62.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., and Wang, Y. (2020).** Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**: 107. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
- Gutiérrez-Correa, M. & Villena, Gr. (2010).** Characteristics and techniques of fermentation systems. Edition: First Chapter: 7, Volume IPublisher : Asiatech Publisher, Inc. New Delhi. Editors: A. Pandey, C.R. Soccol, C. Larroche, E. Gnansounou, C.-G. Dussap
- Haddar, H. O., Aziz, G. M., Al-Gelawi, M. H. (2007).** Optimization of bacitracin production by *Bacillus licheniformis* B5. *Pak. J. Biol. Sci.*, **10**(6): 972-976.
- Haj-Husein, L. (2013).** Impact de l'agitation et de l'aération sur la réponse physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* DSMZ 40338 lors de sa culture en bioréacteurs mécaniquement agité et gazosiphon. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine - ENSAIA, 262 p.
- Hamedi, J., Mohammadipanah, F., & Wink, J. (2017).** The role of actinobacteria in biotechnology. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria.*, (Chapter 10) 269–328. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1_10
- Hamid, A. A., Ariffin, S., Mohamad, S. A. S. (2015).** Identification and optimal growth conditions of Actinomycetes isolated from mangrove environment. *Malaysian J Anal Sci.*, **19**(4): 904–910
- Hamza, K., Bouali, H., Bouras, N., Bouallala, M., Badji, B., Klenk, H. P., & Sabaou, N. (2018).** Effet des monosaccharides sur la croissance et la production de chloramphénicol chez deux souches de *Saccharothrix longispora* (PAL 54 et PAL 42) isolées d'un sol de la palmeraie de Ghardaïa. *African Review of Science, Technology and Development.*, **3**(1): 38-50
- Harveson, R. & Kimbrough, J.W. (2000).** First report of *Persiciospora moreaui*, a parasite of *Fusarium oxysporum*, in the Western Hemisphere. **76**: 361-365.
- Hata, T., Omura, S., Iwai, Y., Ohno, H., Takeshima, H. Yamaguchi N. (1971).** A new antibiotic kinamycin: fermentation, isolation, purification and properties. *J. Antibiot.*, **24**: 353-359.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hayakawa, M. & Nonomura, H. (1987).** Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol.*, **65**: 501–509.
- Hofer, A., Hauer, S., Kroll, P., Fricke, J. & Herwig, C. (2018).** In-depth characterization of the raw material corn steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium chrysogenum*. *Process Biochemistry.*, **70**: 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.008>
- Horvath, G., Brazhnikova, M.G., Konstantinova, N.V., Tolstykh, I.V. and Potapova, N.P. (1979).** The structure of nocamycin, a new antitumor antibiotic. *J. Antibiot.*, **32**: 555-558.
- Hoskisson, P., A., Fernández-Martínez, L., T. (2018).** Regulation of specialised metabolites in actinobacteria—expanding the paradigms. *Environ. Microbiol. Rep.*, **10**: 231–238.
- Hsieh, C., Tsai, M. J., Hsu, T. H., Chang, D. M., & Lo, C. T. (2005).** Medium Optimization for polysaccharide production of *Cordyceps sinensis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, **120**(2): 145–158.
- Hu, Y. T., Zhou, P. J., Zhou, Y. G., Liu, Z. H., & Liu, S. J. (2004).** *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi Lake, Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**: 2091–2094.
- Huang, W. C. & Tang, I. C. (2007).** Bacterial and yeast cultures – Process characteristics, products, and applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources.*, 185–223. <https://doi.org/10.1016/b978-044452114-9/50009-8>
- Hug, J., Bader, C., Remškar, M., Cirnski, K. & Müller, R. (2018).** Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. *Antibiotics.*, **7**(2): 44. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020044>
- Hug, J. J., Krug, D. & Müller, R. (2020).** Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products. *Nat Rev Chem.*, **4**: 172–193. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0176-1>
- Ibeyaima, A., Dwivedi, A. K., Saini, N., Gupta, S., & Sarethy, I. P. (2017).** *Saccharothrix* sp. TD-093 from the Thar Desert, India: Metabolite fingerprinting of antimicrobial compounds and in silico analysis. *Current Microbiology.*, **74**(3): 334-343. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1183-9>.
- Ibeyaima, A., Singh, A. K., Lal, R., Gupta, S., Goodfellow, M., & Sarethy, I. P. (2018).** *Saccharothrix tharensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from the Thar Desert, India. *Antonie van Leeuwenhoek.* **111**(11): 2141-2147. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1106-9>
- Islam, M. R., Jeong, Y. T., Ryu, Y. J., Song, C. H., and Lee. Y. S. (2009).** Isolation, identification and optimal culture conditions of *Streptomyces albidoflavus* C247 producing antifungal agents against *Rhizoctonia solani* AG2-2. *Mycobiol.*, **37**(2) : 114-120. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.2.114>
- Isshiki, K., Sawa, T., Naganawa, H., Matsuda, N., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., Oosono, M., Ishizuka, M. & other authors. (1989).** 3-O-isobutyrylkinamycin C and 4-deacetyl-4-Oisobutyrylkinamycin C, new antibiotics produced by a *Saccharothrix* species. *J. Antibiot. (Tokyo).*, **42**: 467–469.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jackson, S. A., Crossman, L., Almeida, E. L., Margassery, L. M., Kennedy, J., and Dobson, A. D. W., (2018).** Diverse and abundant secondary metabolism biosynthetic gene clusters in the genomes of marine sponge derived *Streptomyces* spp. isolates. *Mar. Drugs.*, **16**: 1–18. <https://doi.org/10.3390/md16020067>
- Jain, R., Zaidi, K. U., Parveen, N., Saxena, A (2011).** Optimization of Cultural Conditions for the Production of Antibiotic by *Streptomyces* sp. VRY-1. *Recent Research in Science and Technol.*, **3**: 81-87.
- Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., & Solecka, J. (2018).** Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish journal of microbiology.*, **67**(3): 259–272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
- James, P. D. A., Edwards, C. (1988).** The effect of cultural conditions on growth and secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown on chemostat. *FEMS Microbiol Lett.*, **52**: 1–6.
- James, P. D., Edwards, C., Dawson, M. (1991).** The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. *J. Gen. Microbiol.*, **137**(7): 1715-1720.
- Jayaprakashvel, M. Ramabhai. (2018).** Prospects of rare actinomycetes for the production of newer antibiotics. *Oceanography & Fisheries Open access Journal.*, **6**(5): 555699. <https://doi.org/10.19080/OFOAJ.2018.06.555699>.
- Jonsbu, E., Ellingsen, T.E., & Nielsen, J. (2001).** Effects of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by *Streptomyces noursei*. *The Journal of antibiotics.* (Tokyo)., **53**(12): 1354-1362. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.1354>.
- Jonsbu, E., McIntyre, M., Neilson, J. (2002).** The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J. Biotechnol.*, **95**(2): 133-144.
- Jose, P. A., Sivakala, K. K., Jebakumar, S. R. D. (2013).** Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06. *Int. J. Microbiol.*, **2013**: 526-260. <https://doi.org/10.1155/2013/526260>
- Jose, P. A., and Jha, B. (2016).** New dimensions of research on actinomycetes : quest for next generation antibiotics. *Front., Microbiol.*, **7**: 1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01295>
- Joshi, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai A. J. (2006).** Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. *J Microbiol Biotechnol.*, **17**(2): 313-9.
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., Walsh, C. (2005).** Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem. Rev.*, **105**(2): 425–448.
- Kalinovskaya, N. I., Kalinovskiy, A. I., Romanenko, L. A., Dmitrenok, P. S., and Kuznetsova, T. A. (2010).** New angucyclines and antimicrobial diketopiperazines from the marine mollusk-derived actinomycete *Saccharothrix espanaensis* An 113. *Nat. Prod. Commun.*, **5**: 597–602.
- Kanmani, P., Karthik, S., Aravind, J., Kumaresan, K. (2013).** The use of response surface methodology as a statistical tool for media optimization in lipase production from the dairy effluent

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

isolate *Fusarium solani*, *International Scholarly Research Notices.*, <https://doi.org/10.5402/2013/528708>

Kat, L. and Baltz, R. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of industrial microbiology & biotechnology.*, **43**(2-3): 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>.

Kati, A., Aytakin, A., Üstün-Aytakin, Ö., Sahin, F. (2017). Simultaneous optimization of protease and biopesticide productions: a case study with industrial perspective. *Akademik Gıda* **15**(4) (2017) 327-336

Katz, L., and Baltz, R., H. (2016). Natural product discovery : past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **4**: 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>

Karuppiyah, V., Wei, S., Zhiyong, L. (2014). Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **98**: 7365–7377. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5954-6>

Kaur, D. C., Chate, S. S. (2015). Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to newer antibiotic. *J Glob Infect Dis.*, **7**(2) : 78-84. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.157245>

Kaur, A., Rishi, V., Soni, S., K. et al. (2020). A novel multi-enzyme preparation produced from *Aspergillus niger* using biodegradable waste : a possible option to combat heterogeneous biofilms. *AMB Expr.*, **10** : 36. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-00970-3>

Kavitha, A., et Savithri, H., S. (2017). Biological significance of marine *Actinobacteria* of east coast of Andhra Pradesh, India. *Frontiers in Microbiology.*, **8**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01201>

Keil, T., Landenberger, M., Dittrich, B., Selzer, S., & Büchs, J. (2019). Precultures grown under fed-batch conditions increase the reliability and reproducibility of high-throughput screening results. *Biotechnology Journal.*, 1800727. <https://doi.org/10.1002/biot.201800727>

Kennedy, M., and Krouse, D. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance : a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* **23** : 456–475.

Khebizi, N., Boudjella, H., Bijani, C., Bouras, N., Klenk, H. P., Pont, F., et al. (2017). Oligomycins A and E, major bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. strain HG29 isolated from a Saharan soil. *J Mycol Med.*, **28**:150-160. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.10.007>

Kim, B., Y., Brown, R., Labeda, D., P. and Goodfellow, M. (2011). - Reclassification of *Dactylosporangium variesporum* as *Saccharothrix variisporaea* corrig. (ex Tomita et al. 1977) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**: 310-314.

Kinoshita, N., Igarashi, M., Ikeno, S., Hori, M. & Hamada, M. (1999). *Saccharothrix tangerinus* sp.nov., the producer of the new antibiotic formamicin: taxonomic studies. *Actinomycetologica*, **13**: 20–31.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kimura, T., Nakamura, K. & Takahashi, E. (1995).** Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. II. structure determination. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **48**: 1130–1133.
- Kirkpatrick, P., Raja, A., La Bonte, J., Lebbos, J., (2003).** Daptomycin. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2**(12) : 943–944.
- Kiruthika, P., Nisshanthini, S. D., Saraswathi, A., Rajendiran, R. (2011).** Application of statistical design to the optimization of culture medium for biomass production by *Exiguobacterium* sp. HM 119395. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.*, **2** : 422-430.
- Kona, R. P., Qureshi, N., & Pai, J. (2001).** Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource technology*. **78**: 123-6. [https://doi.org/ 10.1016/S0960-8524\(01\)00014-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00014-1).
- Kong, F., Zhao, N., Siegel, M. M., Janota, K., Ashcroft, J. S., et al. (1998).** Saccharomicins, novel Heptadecaglycoside antibiotics effective against multidrug-resistant bacteria. *J Am Chem Soc.*, **120**: 13301-13311.
- Kumar, K., Gupta, S.C., Baidoo, S., Chander, Y., Rosen, C. (2005).** Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of environmental quality*. **34**: 2082-5. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0026>.
- Laassami, A. (2015).** Effet de quelques sources nutritionnelles sur la production d'antibiotiques par la souche SA198 de *Saccharothrix* sp. en milieu de culture semi-synthétique. Thèse de magistère de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba., 97p
- Labeda, D. P., Testa, R. T., Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. A. (1984).** *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiopsis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **34**: 426–431.
- Labeda, D. P. and Lechevalier, M. P. (1989).** Amendment of the genus *Saccharothrix* (Labeda *et al.*, 1984) and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**: 420-423.
- Labeda, D. P. and Kroppenstedt, R. M. (2000).** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa : proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50** : 331-336.
- Labeda, D. P., Goodfellow, M. (2012)** Family 1. *Pseudonocardiaceae* Embley, Smida and Stackebrandt, 1989, 205vp emend Labeda, Goodfellow, Chun, Zhi and Li 2010a. In : Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, the *Actinobacteria*, Part B, vol 5, 2nd edn. New York, Springer, pp 1302–1305
- Lahoum, A., Bouras, N., Mathieu, F., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H.-P. & Sabaou, N. (2016a).** *Actinomadura algeriensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **109**: 159–165.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lahoum, A., Bouras, N., Verheecke, C., Mathieu, F., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H.-P. & Sabaou, N. (2016b).** *Actinomadura adrarensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66** : 2724–2729.
- Lahoum, A. (2017).** Souches d'actinobactéries mycéliennes des sols sahariens : mise en évidence de nouvelles espèces et de nouveaux antibiotiques et réduction de la concentration en aflatoxine B1. Thèse de doctorat, école Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 269P.
- Lahoum, A., Sabaou, N., Bijani, C., Bouras, N., Pont, F., Snini, S. P., Mathieu, F. (2019).** Antimicrobial activities of novel bipyridine compounds produced by a new strain of *Saccharothrix* isolated from Saharan soil. *Saudi Pharm J.*, **27**: 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.019>
- Lam, K. S., Schroeder, D. R., Veitch, J. M., Colson, K. L., Matson, J. A., Rose, W. C., Forenza, S. (2001).** Production, isolation and structure determination of novel Fluoroindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *The Journal of Antibiotic.s*, **54**(1): 1-9
- Lam, K. S. (2006).** Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**: 245–251.
- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. & Tillequin, F. (2002a).** New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I.Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **55**: 696–701.
- Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. & Tillequin, F. (2002b).** New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **55**: 702–706.
- Lamari, L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie. 186 p.
- Larpent-Gourgau, M. et Sanglier, J.J. (1992).** Biotechnologie. Principes et méthodes. Doin éditeurs. Paris. France.
- Larpent, J. P. & Sanglier, J. J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Masson éditeurs. Paris. France.
- Lawford, H.G., Rousseau, J.D. (1997).** Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas* ethanol fermentations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63**: 65,287–304.
- Amadi, L., & Ngerebara, N., (2017).** Effects of various concentrations of lactose, lactic acid, corn steep liquor and sodium chloride on the growth of *Penicillium notatum* and penicillin production. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences.*, **7**(3): 857-864.
- Lawson, P. A. (2018).** The phylum *actinobacteria*, in the *Bifidobacteria* and related organisms. Biology, Taxonomy, Applications, eds Mattarelli P., Biavati B., Holzapfel W. H., Wood B. J. B, editors. (London : Elsevier ; Academic Press), 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00001-6>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (2001).** Rare genera of actinomycetes as potential sources of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **78**: 399-405. <https://doi.org/10.1023/A:1010287600557>.
- Lebrihi, A., Lamsaif, D., Lefebvre, G. and Germain, P. (1992).** - Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**: 382-387.
- Lee, I. H., Fredrickson, A. G., Tsuchiya, H. M. (1974).** Diauxic growth of *Propionibacterium shermanii*. *Appl Microbiol.*, **28**(5): 831-5.
- Lee, S-D., Kim, E., Roe, J-H., Kim, J-H., Kang, S., & Hah, Y. (2000).** *Saccharothrix violacea* sp. nov., isolated from a gold mine cave, and *Saccharothrix albidocapillata* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* **50**(3):1315-1323. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1315>.
- Lee, K. (2005).** A media design program for lactic acid production coupled with extraction by electrodialysis. *Bioresour. Technol.*, **96**: 1505-1510.
- Lee, L-H., Chan, K-G., Stach, J, Wellington, E., M., H. and Goh, B-H. (2018).** Editorial : The search for biological active agent(s) from *Actinobacteria*. *Front. Microbiol.*, **9** : 824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00824>
- Lee, A., de Lencastre, H., Garau, J. et al. (2018).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* **4**:18033 <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Lee, R. (2019).** Statistical design of experiments for screening and optimization. *Chemie Ingenieur Technik.*, **91** (3) : 1–11. <https://doi.org/10.1002/cite.201800100>
- Lertcanawanichakul, M., Sawangnop, S. (2008).** A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak J. Sci. Tech.*, **5**: 161–171.
- Li Z., Gao X., Fan D., Xia Y., Huang L. (2015).** *Saccharothrix yanglingensis* strain Hhs.015 Is a promising biocontrol agent on apple valsa canker. *Plant Dis.*;100:510–514. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0190-RE>.
- Li, Y-Q., Liu, L., Cheng, C., Shi, Y-H., Lu, Y., Dong, Z-Y., Salam, N., An, D., D., Li, W-J. (2015).** *Saccharothrix lopnurensis* sp. nov., a filamentous actinomycete isolated from sediment of Lop Nur. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, **108**: 975–981
- Li, F., Wang, Y., Li, D., Chen, Y., & Ping Dou, Q. (2019).** Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery.*, **14**:5, 417-42., <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1582639>
- Lin, Y. B., Guo, Y. Q., Di, X. H., Fan, M. C., Dong, D. H. and Wei, G., H. (2016).** *Saccharothrix stipae* sp. nov., an actinomycete isolated from the rhizosphere of *Stipa grandis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66**: 1017-1021.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pedersen. (2000).** Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **38**(1): 471.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Liu, W., Ahlert, J., Gao, Q., Wendt-Pienkowski, E., Shen, B. and Thorson, J., S. (2003).** Rapid PCR amplification of minimal enediyne polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**: 11959-11963.
- Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R. J., Chambers, H. F. (2011).** Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical Infectious Diseases.*, **52**(3) : e18–e55. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq146>.
- Liu, C., Guan, X., Wang, T. S., Zhao, J., Wang, H. He, H., Xiang, W., Wang, X. (2014).** *Saccharothrix carnea* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **64**: 4033–4037
- Liu, X., Wang, X., Xu, J., Xia, J., Lv, J., Zhang, T., ... He, J. (2015).** Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins. *Industrial Crops and Products.*, **78** : 154–160.
- Liu, L., Salam, N., Jiao, J.-Y., Jiang, H.-C., Zhou, E.-M., Yin, Y.-R., ... Li, W., J. (2016).** Diversity of culturable thermophilic actinobacteria in hot springs in Tengchong, China and studies of their biosynthetic gene profiles. *Microb. Ecol.*, **72** : 150–162. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0756-2>
- Lo Grasso, L., Chillura-Martino, D. and Alduina, R. (2016).** Production of antibacterial compounds from Actinomycetes, *Actinobacteria - basics and biotechnological applications*, Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, *Intech Open.*, Chapter 7. <https://doi.org/10.5772/61525>.
- Lounes A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G., Germain P. (1996).** Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens* : effects of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 204-211. <https://doi.org/10.1007/s002530050671>
- Lu, S., Nishimura, S., Hirai, G., Ito, M., Kawahara, T., Izumikawa, M., ... Kakeya, H. (2015).** Saccharothriolides A–C, novel phenyl-substituted 10-membered macrolides isolated from a rare actinomycete *Saccharothrix* sp. *Chemical Communications.*, **51**(38) : 8074–8077.
- Lu, S., Nishimura, S., Ito, M., Tsuchida, T. and Kakeya, H., J. Nat, Prod., (2016).** Isolation and structure elucidation of cytotoxic saccharothriolides D to F from a rare actinomycete *Saccharothrix* sp. and their structure–activity relationship. *J. Nat. Prod.*, **79**(7) : 1891–1895.
- Lu, S., Nishimura, S., Takenaka, K., Ito, M., Kato, T. and Kakeya, H. (2018).** Discovery of Presaccharothriolide X, a retro-michael reaction product of Saccharothriolide B, from the rare actinomycete *Saccharothrix* sp. A1506. *Org. Lett.*, **20**(15): 4406–4410. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01535>
- Luepke, K. H. & Mohr J. F. III. (2017).** The Antibiotic Pipeline: Reviving Research and Development and Speeding Drugs to Market, *Expert Review of Antiinfective Therapy.*, **15**(5): 425–433. <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1308251>
- Lule, V. K., Garg, S., Gosewade, S. C., & Khedkar, C. D. (2016).** Natamycin. *Encyclopedia of Food and Health.*, 56–62. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00482-7>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (1997).** Antibiotics : isolation and characterization. In : Brock Biology of Microorganisms, 8th(ed), Prentice-Hall International Inc. New Jersey., 440-442
- Maddipati, P., Atiyeh, H. K., Bellmer, D. D., & Huhnke, R. L. (2011).** Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource Technology.*, **102**(11) : 6494–6501
- Magnusson, U., Sternberg, S., Eklund, G., Rozstalnyy, A. (2019).** Prudent and efficient use of antimicrobials in pigs and poultry. FAO Animal Production and Health Manual 23. Rome. FAO.
- Mahajan, G. B., and Balachandran, L. (2017).** Sources of antibiotics: Hot springs. *Biochem Pharmacol.*, **134**: 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.021>.
- Mandenius, C.F. and Brundin, A. (2008).** Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnol Prog.*, **24**(6): 1191-203. <https://doi.org/10.1002/btpr>.
- Mandenius, C. F. (2016).** Bioreactors (Design, Operation and Novel Applications) || Design-of-experiments for development and optimization of bioreactor media., 421–452. <https://doi.org/10.1002/9783527683369.ch15>
- Marques, D. A., V., Cunha, M. N. C., Araujo, J. M., Filho, J. L., Converti, A., Pessoa-Jr, A., Porto, A. L. F. (2011).** Optimization on clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology. *Braz. J. Microbiol.*, **42**(2) : 658-667.
- Martin, J.F. (1979).** Polyene macrolide antibiotics. Acad. Press, Lon, 3, pp. 355-387.
- Martin, J. F. (2004).** Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system : an unfinished story. *J Bacteriol.*, **186**: 5197–5201. <https://doi.org/doi.org/10.1128/JB.186.16.5197-5201.2004>
- Marwick, J. D., Wright, P. C., and Burgess, J. G. (1999).** Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. *Mar. Biotechnol.* **1**: 495–507. <https://doi.org/10.1007/PL00011806>
- Mechlinski, W. (1978).** The polyene antifungal antibiotics. In: Handbook of microbiology. Laskin A.I. and Lechevalier H.A. (Eds). *CRC Press.*, **3**: 93-107.
- Mehmood, N (2011).** Effets de l'hydrodynamique et du transfert d'oxygène sur la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de cultures en flacons agités Thèse de Doctorat à Institut National Polytechnique de Lorraine, France 283 p.
- 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**: 6710-6714. <https://doi.org/10.1128/AEM.00326-11>
- Meklat, A. (2012).** Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie. 162 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Meklat, A., Bouras, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Sproer, C., Klenk, H. P. & Sabaou, N. (2013a). *Actinopolyspora mzabensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from an Algerian Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**: 3787–3792.
- Meklat, A., Bouras, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H. P. & Sabaou, N. (2013b). *Actinopolyspora righensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **104**: 301–307.
- Meklat, A., Bouras, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H. P. & Sabaou, N. (2013c). *Actinopolyspora saharensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil of Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **103**: 771–776.
- Mellouli, L., Karray-Rebai I., Sioud S., Ben Ameer-Mehdi R., Naili B., Bejar S. (2004). Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology.*, **49**: 400-403.
- Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Monje, M. C., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2010). Dithiolopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J. Nat. Prod.*, **73**: 1164–1166
- Merrouche, R. (2012). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiolopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture. Thèse de Doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique. El-Harrach. 197 p.
- Merrouche, R., Yekkour, A., Coppel, Y., Bouras, N., Zitouni, A., Lebrihi, A., Mathieu, F., Sabaou, N., (2019). A new dithiolopyrrolone antibiotic triggered by a long fermentation of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 in sorbic acid-amended medium. *Letters in Applied Microbiology.*, (69),
- Metsä-Ketelä, M., Salo, V., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mäntsälä, P., et al. (1999). An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**: 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08770.x>
- Minas, W., Bailey, J. E., and Duetz, W. (2000). Streptomycetes in micro-cultures : growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, **78**: 297–305
- Mkk, F., Mhm, N., Rashid, S., Ukaegbu, C., Ramli, A. N. M. (2018). A clinical update on antibiotic resistance gram-negative bacteria in Malaysia-a review. *Journal of International Pharmaceutical Research.* **45** : 270-283.
- Mobarki N. S., Abdullah Almerabi, B., Hattan, A. H. 2019. Antibiotic resistance crisis. *International Journal of Medicine in Developing Countries.*, **3**(6): 561–564. <https://doi.org/10.24911/IJMDC.51-1549060699>
- Molina-Ramírez, C., Castro, M., Osorio, M., et al. (2017). Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*. *Materials (Basel).*, **10**(6): 639. <https://doi.org/10.3390/ma10060639>
- Mookadam, F., Cikes, M., Baddour, L. M., Tleyjeh, I. M., Mookadam, M., (2006). *Corynebacterium jeikeium* endocarditis : a systematic overview spanning four decades. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **25**(6) : 349–353.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Monod, J. (1942).** Diauxie et respiration au cours de la croissance des cultures de *E. coli*. *Ann. Inst. Pasteur.*, **68** : 548-450
- Mohammadipanah, F., Hamedi, J., Carmen Montero-Calasanz, M. del, Spröer, C., Klenk, H.-P. & Schumann, P. (2015).** *Saccharothrix ecbatanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**: 4544–4549.
- Mohammadipanah, F. & Wink, J. (2016).** Actinobacteria from arid and desert habitats : Diversity and biological activity. *Front. Microbiol.*, **6**: 1541. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01541>
- Mohr, K. I. (2016).** History of antibiotics research. How to overcome the antibiotic crisis. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **398**: 237–272. https://doi.org/10.1007/82_2016_499
- Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S. and Bogatzevska, N. (2002).** Characteristics of soil actinomycetes from antarctica. *Journal of Culture Collections.*, **3**: 3-14.
- Moise, P. A., Schentag, J. J. (2000).** Vancomycin treatment failures in *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Int J Antimicrob Agents.*, **1**: 31-34. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00303-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00303-4)
- Morris, P. J. (1984).** The impact of Cyclosporin A on transplantation. *Adv. Surg.*, **17**: 99–127.
- Murakami, R., Shinozaki, J., Kajiura, T. et al. (2009).** Ammocidins B, C and D, new cytotoxic 20-membered macrolides from *Saccharothrix* sp. AJ9571. *J Antibiot.*, **62**: 123–127. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.23>
- Muralidhar, R., Chirumamila, R., Marchant, R., Nigam, P., (2001).** A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochem. Eng. J.*, **9**: 17–23
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. M. (2016).** Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons. p. 704
- Nakae, K., Kurata, I., Kojima, F., Igarashi, M., Hatano, M., Sawa, R., Kubota, Y., Adachi, H. & Nomoto, A. (2013).** Sacchathridine A, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix* sp. *J. Nat. Prod.*, **76**: 720–722.
- Neves, A. A., Vieira, L. M. & Menezes, J. C. (2001).** Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering.*, **72**(6) : 628–633.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. J. (1997).** Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.*, **60**(1): 52-60. <https://doi.org/10.1021/np9604893>.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.*, **66**(7): 1022-37. <https://doi.org/10.1021/np030096l>.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2007).** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.*, **70**(3): 461-77. <https://doi.org/10.1021/np068054v>.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **75**: 311–335. <https://doi.org/10.1021/np200906s>
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.*, **1830**(6): 3670-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.*, **79**(3): 629-61. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.*, **83**(3): 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- Nicola, A. M., Albuquerque, P., Costa, Paes, H., Fernandes, L. F., Costa, F., Seki Kioshima, E., Rodrigues, Abadio, A. K., Lorenzetti, Bocca., A., Felipe, M. (2019). Antifungal drugs : New insights in research & development. *Pharmacol Ther.*, **195**: 21-38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.10.008>
- Nishanth, K., Nambisan, B., Ramya, R. & Mohandas, C. (2013). Influence of carbon and nitrogen sources on antifungal metabolite production by bacterium associated with entomopathogenic nematode against *Penicillium expansum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.*, 46.
- Niewiadomska, A.M., Jayabalasingham, B., Seidman, J.C. et al. (2019). Population-level mathematical modeling of antimicrobial resistance : a systematic review. *BMC Med.*, **17**: 81. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1314-9>
- Nikolouli, K. & Mossialos, D. (2012). Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnology Letters.*, **34**(8) : 1393–1403. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0919-2>
- Ohta, N., Park, Y. S., Yabiro, K., Okabe, M. (1995). Comparison of neomycin production from *Streptomyces fradiae* cultivation using soybean oil as the sole carbon source in an airlift bioreactor and a stirred-tank reactor. *J. Ferment. Bioeng.*, **79**: 443-448.
- Omura, S. & Tanaka, J (1986). In: Regulation of secondary metabolites. VCH, Berlin. pp. 306–332
- Oskay, M., Tamer, A. U., Azeri, C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology.*, **3**(9), 2–. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2087>
- Otoguro, M., Tamura, T., Suzuki, K., Hayakawa, M. (2009). *Saccharothrix violaceirubra* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *Int J Syst Evol.*, **59**: 1504–1507
- Pan R, Bai X, Chen J, Zhang H and Wang H (2019) Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A Literature Review. *Front. Microbiol.*, **10**:294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00294>
- Pandey, A., Shukla A. and Majumdar S.K. (2005). Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Antibacterial antibiotic. *African J. Biotech.*, **4**: 909-910.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pareek, S., Mathur, N., Singh, A. and Nepalia, A. (2015).** Antibiotics in the environment : A review. *International Journal Current Microbiological and Applied Sciences.*, **11**: 278-285.
- Parungao, M. M., Maceda, E. B. G. and Villano, M. A. F. (2007).** Screening of antibiotic producing actinomycetes from marine, brackish and terrestrial sediment of Samal Island, Philippines. *J. Res. Sci. Comput. Eng.*, **4**: 29-38.
- Passari, A. K., Mishra, V. K., Saikia, R., Gupta, V. K., Singh, B. P. (2015).** Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro, antimicrobial biosynthetic potential. *Front. Microbiol.*, **7**(6): 273. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00273>
- Patvin, J., Peringer, P. (1994).** Ammonium regulation in *Sachharopolyspora erythraea*. part I : growth and antibiotic production. *Biotechnol. Lett.*, **6**(1): 63-68.
- Peebles, E., Morris, R., Chafe, R. (2014).** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric emergency department in Newfoundland and Labrador. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*, **25** : 13-16 <https://doi.org/10.1155/2014/267901>
- Pereira, F. B., Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., Domingues, L. (2010).** Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresour Technol.*, **101**: 7856-7863
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H., Fiedler, H. (2000).** Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Biotechnol.*, **80**: 135-142.
- Pharm, M. (2010).** Thesis submitted in partial fulfillment for the award of degree of : Vinayaka Missions University
- Plackett, R. L. & Burman, J. P. (1946).** The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika.*, **33**: 305–325.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Bacq-Calberg, C. M., Dusart, J. (2002).** Microbiologie. De Boeck Université. 1147p.
- Pringsulaka, O., Chavanic, S. (1999).** Optimal conditions for the production of kanamycin by *Streptomyces kanamyceticus* mutants. *J. Sci. Res. Chula. Univ.*, **24**(2): 103-114
- Qin, S., Li, J., Chen, H. H., Zhao, G. Z., Zhu, W. Y., et al. (2009).** Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rainforests, Xishuangbanna : China. *Appl Environ Microbiol.*, **75**(19): 6176-6186.
- Qiu, P., Cui, M., Kang, K., Park, B., Son, Y., Khim, E., ... Khim, J. (2013).** Application of Box-Behnken design with response surface methodology for modeling and optimizing ultrasonic oxidation of arsenite with H₂O₂. *Central European Journal of Chemistry.*, **12**(2) : 164–172. <https://doi.org/10.2478/s11532-013-0360-y>
- Raffienia, R. (2013).** Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomyces*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences.*, **3**: 810-815.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ramakrishnan, V., Goveas, L. C., Narayan, B., Halami, P. M. (2013).** Comparison of lipase production by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 and *Pediococcus acidilactici* MTCC 11361 using fish waste as substrate: optimization of culture conditions by response surface methodology. *ISRN Biotechnology.*, 1–9.
- Ramos, H., P. and Said, S. (2011).** Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **2** : 443–449
- Rangseekeaw, P. and Pathom-aree, W. (2019).** Cave Actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Front. Microbiol.*, **10**: 387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00387>
- Ravikumar, S., Fredimoses, M., Gnanadesigan, M. (2012).** Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF–7 and MDA–MB–231 cell lines. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, **2**: 92–96.
- Rizk, M. T., Metwally, H. (2007).** Factors affecting growth and antifungal activity of some *Streptomyces* species against *Candida albicans*. *J Food Agricul Environ.*, **5**: 446–449.
- Robertsen, H. L., Musiol-Kroll, E. M. (2019).** Actinomycete-derived polyketides as a source of antibiotics and lead structures for the development of new antimicrobial drugs. *Antibiotics (Basel).*, **8**(4):157. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040157>
- Romano, S., Jackson, S., Patry, S., Dobson, A. (2018).** Extending the “One strain many compounds” (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms. *Marine Drugs.*, **16**(7): 244–. <https://doi.org/10.3390/md16070244>
- Rutledge, P. J. & Challis, G. L. (2015).** Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat. Rev.Microbiol.*, **13**, 509–523
- Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., Bennadji, H., Lefèbvre, G. & Germain, P. (1998).** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d’actinomycètes, rares producteurs d’antibiotiques. *Sécheresse.*, **9**: 147–153.
- Safroy, S. (2006).** Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat, INPL-ESSAIA, 186 p.
- Saker, R., Meklat, A., Bouras, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Spröer, C., ... Sabaou, N., (2015).** Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara : M’zab and Zibans. *Annals of Microbiology.*, **65**(4) : 2241–2253. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1065-6>
- Saker, R., Bouras, N., Meklat, A., Zitouni, A., Schumann, P., Sproer, C., Sabaou, N. & Klenk, H.-P. (2015a).** *Prauserella isguenensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from desert soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**: 1598–1603.
- Saker, R., Bouras, N., Meklat, A., Zitouni, A., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H.-P. & Sabaou, N. (2015b).** *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from northern Sahara. *Curr. Microbiol.*, **70**: 423–428.
- Sanchez, S., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Hunte, Y., Romero, A., Sanchez, M., Rocha, D., Sanchez, B., Avalos, M., Guzman-Trampe, S., Rodriguez-Sanoja, R., Langley, E. and Ruiz, B. (2010).** Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.*, **63**: 442–459.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Satoh, A., Ogawa, A. H., Satomura, Y. (1976).** Regulation of N-acetyl kanamycin amidohydrolase in the idiophase in kanamycin fermentation. *Agr. Biol. Chem.*, **40**(1): 191-196.
- Sarada, I. & Sridhar, P. (1998).** Nutritional improvement for Cephamycin C fermentation using a superior strain of *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry.*, **33**(3): 317–322. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(97\)00086-1](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(97)00086-1)
- Sa-uth, C., Rattanasena, P., Chandrapatya, A. & Bussaman, P. (2018).** Modification of medium composition for enhancing the production of antifungal activity from *Xenorhabdus stockiae* PB09 by using response surface methodology. *International Journal of Microbiology.*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijm.2018.09.001>
- Saxena, J. & Tanner, R. (2011).** Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*. *World journal of microbiology & biotechnology.*, **28**(4): 1553-1561. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0959-0>.
- Schrader, M., Pommerehne, K., Wolf, S., Finke, B., Schilde, C., Kampen, I., ... Kwade, A. (2019).** Design of a CFD-DEM-based method for mechanical stress calculation and its application to glass bead-enhanced cultivations of filamentous *Lentzea aerocolonigenes*. *Biochemical Engineering Journal.*, S1369-703X(19)30132-9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.04.014>
- Schimmerling, P., Sisson, J-C., Zaidi, A. (1998).** Pratique des plans d'expériences. Ed. Lavoisier Tec & Doc
- Shapiro, S. (1989).** Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. In : Shapiro S (ed) Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. *CRC Press, Boca Raton.*, 135–211.
- Sharma, N., Prasad, G. S. & Choudhury, A. R. (2013).** Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydrate Polymers.*, **93**(1): 95–101.
- Sharma, H.K., Singh, B., & Sarkar, B.C. (2012).** Optimization of extraction of antioxidants from wheat bran (*Triticum spp.*) using response surface methodology. *J Food Sci Technol.*, **49**: 294–308 <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0276-5>
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.*, **16**: 313–340.
- Schumacher, R.W., Harrigan, B.L. and Davidson, B.S. (2001).** Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron Lett.*, **42**: 5133-5135.
- Siebenberg, S., Bapat, P. M., Lantz, A. E., Gust, B. & Heide, L. (2010).** Reducing the variability of antibiotic production in *Streptomyces* by cultivation in 24-square deepwell plates. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, **109**(3): 230–234.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010).** The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2**(5): a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- Silver, L. L. (2011).** Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews.*, **24**(1): 71–109. <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10>.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Singh, M. P., Petersen, P. J., Weiss, W. J., Kong, F., Greenstein, M., et al. (2000).** Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob Agents Chemother.*, **44**: 2154-2159.
- Singh, D. & Gurvinder, K. (2012).** Optimization of different process variables for the production of an indolizidine alkaloid, swainsonine from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of basic microbiology.*, **52** (5): 590-7.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C. K. M. (2017).** Strategies for fermentation medium optimization : an in-depth review. *Front Microbiol.*, **7**: 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.wang2016.02087>
- Sircar, A., Sridhar, P. and Das, P. K. (1998).** Optimization of solid-state medium for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, *Process Biochemistry.*, (**33**)3: 283–289. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(97\)00058-7](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(97)00058-7)
- Skov, R. I. & Monnet, D. I. (2016).** Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene) : three months later, the story unfolds. *Euro surveill.*, **21**(9): 30155. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>.
- Sorokina, M., Steinbeck, C. (2020).** Review on natural products databases: where to find data in 2020. *J Cheminform.*, **12**: 20. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00424-9>
- Spellberg, B., Gilbert, D. N. (2014).** The future of antibiotics and resistance : a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis.*, **59**(2): S71–S75.
- Stackebrandt, E., Schumann, P. (2006).** Introduction to the taxonomy of actinobacteria, in *The Prokaryotes*, eds Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt F., editors. (New York, NY : Springer), 297–321.
- Strobel, T., Al-Dilaimi, A., Blom, J., Gessner, A., Kalinowski, J., Luzhetska, M., Pühler, A., Szczepanowski, R., Bechthold, A., Rückert, C. (2012).** Complete genome sequence of *Saccharothrix espanaensis* DSM 44229^T and comparison to the other completely sequenced *Pseudonocardiaceae*. *BMC Genomics.*, **13**(1) : 465. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-465>
- Strub, C. (2008).** Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Délivrée par l'Institut National Polytechnique de Toulouse. 202p.
- Strub, C., Brandam, C., & Meyer, X.-M., & Lebrihi, A. (2010).** A stoichiometric reaction scheme for *Saccharothrix algeriensis* growth and thiolutin production. *Process Biochemistry.*, 45.
- Subramani, R., Sipkema, D. (2019).** Marine rare actinomycetes : a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Mar Drugs.*, **17**(5): 249. <https://doi.org/10.3390/md17050249>
- Suzuki, K., Sato, T., Morioka, M., Nagai, K., Abe, K., Yamaguchi, H., Saito, T., Ohmi, Y. & Susaki, K. (1991).** Tetrazomine, a new antibiotic produced by an actinomycete strain. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo).*, **44**: 479–485.
- Taiwo, A. E., Ojumu, T. Victor, Tafirenyika, N. M. (2018a).** Statistical optimization of acetoin production using corn steep liquor as a low-cost nitrogen source by *Bacillus Subtilis* CICC 10025.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Renewable Resources and Biorefineries., E. JACOB-LOPES, L. QUEIROZ ZEPKA (Eds.). <https://doi.org/10.5772/intechopen.79353>.

Taiwo, A., Madzimbamuto, T., Ojumu, T. (2018b). Optimization of corn steep liquor dosage and other fermentation parameters for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* type 1 and anchor instant yeast. *Energies.*, **11**(7): 1740. <https://doi.org/10.3390/en11071740>.

Taiwo, A. E., Madzimbamuto T. N., Ojumu T. V. (2020). Optimization of process variables for acetoin production in a bioreactor using Taguchi orthogonal array design. *Heliyon.*, **6**(10) : e05103. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05103>.

Takahashi, A., Hottan, K., Saito, O., Morioka, M., Okami, Y. & Umezawa, H. (1986). Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardiosis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot. (Tokyo).*, **39**: 175–183.

Takahashi, Y., Matsumoto, A., Seino, K. Iwai, Y., Omura, S. (1996). Rare actinomycetes isolated from desert soils. *Actinomycetologica.*, **10**(2): 91-97. https://doi.org/10.3209/saj.10_91

Takeuchi, M., Takahashi, S., Enokita, R., Sakaida, Y., Haruyama, H., Nakamura, T., Katayama, T., Inukai, I. (1992). Galacardins A and B, new glycopeptide antibiotics. *The Journal of Antibiotics.*, **45**(3): 297-305. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.297>

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

Tan, J. P., Jahim, J. M., Wu, T. Y., Harun, S., Mumtaz, T. (2016). Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science., **36** : 012058.

Tang Y., An M., Liu K., Nagai S., Shigematsu T., Morimura S., Kida K. (2006). – Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Proces. Biochem.*, **41**: 909-914.

Tanyildizi, M.S., Özer, D., Elibol, M., (2005). Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochem.*, **40**: 2291-2296.

Tata, S. Yekkour, A., Mokrane, S., Chaabane Chaouch, F., Bouras, N., Sabaou, N. (2018). Influence of culture media on antifungal activity produced by *Streptomyces* sp. Pal114 isolated from Ghardaïa date palm grove soils. *African Review of Science, Technology and Development.*, **3**(02): 22-29.

Tata, S. (2020). Production d'antibiotiques par *Streptomyces* sp. PAL114 en fonction des sources d'azote et de carbone, mise en évidence de nouvelles molécules et activités biologiques. Thèse de doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba, 128 p

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Taurino, C., Frattini, L., Marcone, G. L., Gastaldo, L., Marinelli, F. (2011).** *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin. *Microbial Cell Factor.*, **10**(1): 82
- Taylor, P. W. (2013).** Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *Int J Antimicrob Agents.*, **42**(3): 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.05.004>
- Techtmann, S. M. and Hazen, T. C. (2016).** Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **43**: 1345–1354.
- Tischler, D., van Berkel, W. J. H., Fraaije, M. W. (2019).** Éditorial : Actinobactéries, une source d'outils biocatalytiques. *Microbiol avant.*, **10**: 800. <https://doi.org/10.3389 / fmicb.2019.00800>
- Temime, L., Hejblum, G., Setbon, M., Valleron, A. J. (2008).** The rising impact of mathematical modelling in epidemiology : antibiotic resistance research as a case study. *Epidemiol Infect.*, **136**(3) : 289–98.
- Theuretzbacher, U., Outtersson, K., Engel, Al., & Karlén, A. (2019).** The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature Reviews Microbiology.*, **18**:1-11. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0288-0>.
- Tiwari, K., Gupta, R. K. (2012).** Rare Actinomycetes : a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology.*, **32**(2): 108–132. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.562482>,
- Toumatia, O. (2010).** Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques : isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger.115 p.
- Tshokey, T., Adhikari, D., Tshering, T., Wangmo, S., Wangdi, K. (2017).** assessing the knowledge, attitudes, and practices on antibiotics among the general public attending the outpatient pharmacy units of hospitals in Bhutan: A Cross-Sectional Survey. *Asia Pac J Public Health.*, **29**(7):580-588. <https://doi.org/10.1177/1010539517734682>.
- Umezawa, H. (1965).** Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrobial. Agents Chemothe.*, **5**: 1079–1085.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y. (1966).** New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.*, **19**(5): 200–209.
- Untrau, S., Lebrihi A., Lefebvre G., Germain P. (1994).** Nitrogen cataboliteregulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiol.*, **28**: 111-118.
- Vajs, J., Proud, C., Brozovic, A., Gazvoda, M., Lloyd, A., Roper, D., I. et al. (2017).** Diaryltriazenes as antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Mycobacterium smegmatis*. *Eur J Med Chem.*, **127**: 223–234
- Valduga, E., Ribeiro, A., Cence, K., Colet, R., Tiggemann, L., Zeni, J. & Toniazzo, G (2013).** Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.*, **3**.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Valgas, C., De Souza, S.M., Smânia, E.F.A., Smânia, E. F. A., Smânia, A. Jr. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.*, **38**: 369-380
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A. et Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, **112**(18): 5649–5654.
- Van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology.*, **18**: 546–558.
- Van Daele, R., Spriet, I., Wauters, J., Maertens, J., Mercier, T., Van Hecke, S., Brüggemann, R. (2019). Antifungal drugs : What brings the future? *Medical Mycology.*, **57**(supplement_3): S328–S343. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz012>
- Van der Heul, H. U., Bilyk, B. L., McDowall, K. J., Seipke, R. F. & van Wezel, G. P. (2018). Regulation of antibiotic production in *Actinobacteria* : new perspectives from the post-genomic era. *Natural Product Reports.*, **35**(6): 575–604. <https://doi.org/10.1039/c8np00012c>
- Van der Stel, A. X., van de Lest, C. H. A., Huynh, S., Parker, C. T., van Putten, J. P. M., and Wosten, M. M. S. M. (2018). Catabolite repression in *Campylobacter jejuni* correlates with intracellular succinate levels. *Environ. Microbiol.*, **20**: 1374–1388. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14042>
- Vastrad, B. M., Nelagund, S. E. (2011). Optimization and production of neomycin from different agro industrial wates in solid state fermentation. *IJPSDR.*, **3**(2): 104-111.
- Velho-Pereira, S., Kamat, N. M. (2011). Antimicrobial screening of actinobacteria using a modified cross-streak method. *Indian J Pharm Sci.*, **73**(2): 223-228. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.91566>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis. Part 1: causes and threats. *P T.*, **40**(4): 277-283.
- 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. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>.
- Vilches, C., Mendez, C., Hardisson, C., Salas, J. A. (1990). Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus* : influence of nutritional conditions and development of resistance. *J. Gen. Microbiol.*, **136**(8): 147-2664
- Waksman, S. A. (1947). What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia.*, **39**: 565–569. <https://doi.org/10.2307/3755196>
- Wall, B. A., Mateus, A., Marshall, L., Pfeiffer, D. U., Lubroth, J., Ormel, H. J., Otto, P. and Patriarchi, A. (2016). Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production, FAO Rome, available at <http://www.fao.org/documents/card/en/c/d5f6d40d-ef08-4fcc-866b-5e5a92a12dbf/>.
- Walsh, C. T. (2007). The chemical versatility of natural-product assembly lines. *Acc. Chem. Res.*, **4**: 4–10. <https://doi.org/10.1021/ar7000414>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wang, Z.X., Li, S.M. and Heide, L. (2000).** Identification of the coumermycin A, biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* and biochemical SSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**: 3040-3048.
- Wang, Y., Fang, X., An, F., Wang, G., Zhang, X. (2011).** Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. *Microb Cell Factories.*, **10**: 98. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-98>
- Wang, X., Tabudravu, J., Jaspars, M., Deng, H. (2013).** Tianchimycins A-B, 16-membered macrolides from the rare actinomycete *Saccharothrix xinjiangensis*. *Tetrahedron.*, **69**: 6060-6064. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.05.094>.
- Wang, L., Zhang, M., Li, Y., Cui, Y., Zhang, Y., Wang, Z., et al. (2017).** Application of response surface methodology to optimize the production of antimicrobial metabolites by *Micromonospora* Y15. *Biotechnol Biotechnol Equip.*, **31**(5): 1016–1025
- Weissman, K. J. (2009).** Introduction to polyketide biosynthesis. In : Hopwood DA, editor. Complex enzymes in microbial natural product biosynthesis, *Part B : Polyketides, aminocoumarins and carbohydrates methods in enzymology*. *Academic Press.*, 3–16.
- Willem, L., Verelst, F., Bilcke, J., Hens, N., Beutels, P. (2017).** Lessons from a decade of individual-based models for infectious disease transmission : a systematic review (2006-2015). *BMC Infect Dis.*, **17**(1): 612
- Williston, E. H., Zia-Walrath, P., Youmans, G. P. (1947).** Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against virulent human type tubercle Bacilli. *J Bacteriol.*, **54**: 563–8.
- Wright, G. D. (2017).** Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Natural Product Reports.*, **34**(7): 694–701. <https://doi.org/10.1039/c7np00019g>
- Williams, D. H. (1996).** The glycopeptide story - How to kill the deadly ‘superbugs’. *Nat. Prod. Rep.*, **13**(6): 469–477.
- Wolfe, N. D., Dunavan, C. P. and Diamond, J. (2007).** Origins of major human infectious diseases. *Nature.*, **447**(7142): 279–283. <https://doi.org/10.1038/nature05775>.
- Woodford, N., Turton, J. F., Livermore, D. M. (2011).** Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.*, **35**(5): 736-55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
- World Health Organisation Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics are Urgently Needed.** Available online: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>(accessed on 27 February 2017).
- Xi, Y., Chen K., Dai W., Ma J., Zhang M., Jiang M., Wei P., Ouyang P. (2013).** Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. *Bioresour. Technol.*, **136**: 775-779.
- Xiao, J. H., Chen, D. X., Liu, J. W., Liu, Z. L., Wan, W. H., Fang, N., Xiao Y., Qi, Y., Liang, Z. Q. (2004).** Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. *Journal of Applied Microbiology.*, **96**(5): 1105–1116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02235.x>.

Xiao, Y., Zhang, X., Zhu, M., Tan, W. (2013). Effect of the culture media optimization, pH and temperature on the biohydrogen production and the hydrogenase activities by *Klebsiella pneumoniae* ECU-15. *Bioresource Tech.*, **137**: 9-17.

Xu, C., Yu, J., Zhao, S., Wu, S., He, P., Jia, X., Liu, Y., Mao, D. (2017). Effect of carbon source on production, characterization and bioactivity of exopolysaccharide produced by *Phellinus vaninii* Ljup. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, **89**(3 suppl.), 2033–2041. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150786>

Yan, X., Huang, L. L., Tu, X., Gao, X. N., Kang, Z. S. (2012). *Saccharothrix yanglingensis* sp. nov., an antagonistic endophytic actinomycete isolated from cucumber plant. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, **101**: 141–146

Yang T.W., Rao Z.M., Zhang X., Xu M.J., Xu Z.H., Yang S.T. (2013). Effects of corn steep liquor on production of 2,3-butanediol and acetoin by *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.*, **48**:1610-1617.

Yao, W., Zhu, J., Sun, B. & Miller, C. (2009). Development and optimization of a culture medium for L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using crude protein from dairy manure as a nitrogen source. *Journal of Environmental Science and Health, Part A.*, **44**(12): 1306–1313.

Yi, J. S., Kim, M. S., Kim, S. J., Kim, B. G. (2015). Effects of sucrose, phosphate, and calcium carbonate on the production of pikromycin from *Streptomyces venezuelae*. *J Microbiol Biotechnol.*, **25**(4): 496-502. <https://doi.org/10.4014/jmb.1409.09009>

Yu L, Pei X, Lei T, Wang Y, Feng Y. (2008). Genome shuffling enhanced L-lactic acid production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus*. *J Biotechnol.*, **20**:134(1-2):154-9.

Yuan, L. J., Zhang, Y. Q., Liu, H. Y., Guan, Y., Lee, J. C., Kim, C. J., Zheng, Y. Q. (2010). *Alloactinosynnema albus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Actinosynnemataceae* isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **60**: 39–43

Zhang, J., Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **51**: 407–421 <https://doi.org/10.1007/s002530051411>

Zhang, G., Mills, D. A., & Block, D. E. (2009). Development of Chemically Defined Media Supporting High-Cell-Density Growth of *Lactococci*, *Enterococci*, and *Streptococci*. *Applied and Environmental Microbiology.*, **75**(4): 1080–1087

Zhang, D., Lu, Y., Chen, H. et al. (2020). Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *J Antibiot.*, **73**: 265–282. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>

Zhou, Y., Sun Y. B., He, H. W., Feng, J. T., Zhang, X., Han, L. R. (2017). Optimization of medium compositions to improve a novel glycoprotein production by *Streptomyces kanasensis* ZX01. *AMB Express.*, **7**(1): 6. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0316-7>.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zhu, C. H., Lu, F. P., He, Y. N., Han, Z. L., Du, L. X. (2007).** Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes* : effect of glucose, ammonium ion and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**(5): 1031-1038. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0572-6>
- Zitouni, A. (1995).** Les genres *Nocardioopsis* et *Saccharothrix* (Actinomycetales) dans les sols sahariens : taxonomie numérique, extraction, purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. Mémoire de Magistère. École Normale Supérieure de Kouba, Alger, 177 p.
- Zitouni, A. (2004).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardioopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 230 p.
- Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. & Labeda, D. P. (2004a).** *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**: 1377–1381.
- Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2004b).** Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **57**: 367–372.
- Zitouni, A., Mathieu, F., Coppel, Y., Pont, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2004c).** Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103: II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **57**: 373–378.
- Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2005).** *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria : isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology.*, **156**(10): 984–993. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005>.
- Zitouni, A. (2005).** Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardioopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 230 p.
- Zou, X., Hang, H., Chu, J., Zhuang, Y. & Zhang, S. (2009).** Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50L to 372m³ scale. *Bioresource Technology.*, **100**(3): 1406–1412.

ANNEXE

ANNEXE

Séquences d'ADNr 16S de la souche *Sx. tamanrassetensis* SA198 étudiée « SA198-S1 »

GGGTGGAAAGTTCCGGCGGTATGGGATGGACCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGG
GTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
AACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGTCGCGGCCGTGAAAACCTTCACGCTTAA
CGTGGAGCCTGCGGTTCGATACGGGCAGACTTGAGTTCGGCAGGGGAGACTGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGG
TCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTGCTAGGTGTGGGGGACTTCCACGTTC
TCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTA
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCACCGGAAACCCATAGAGATAT
GGGCCTCTTCGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAG
ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCATGTTGCCAGCGCGTTAT
GGCGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGYACAGA
GGGCTGCTAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCACAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCG
GGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACG
CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGTCACGTCACGAAAGTCGG
TAACACCCGAAGCCCGTGNCCCAACCCGTAAGGGGGGAGCGTCAA

Séquences d'ADNr 16S *Sx. tamanrassetensis* DSM 45947

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCC
CTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTGTAC
TCTGGGATAAGCCTGGGAAACTAGGTCTAATACCGGATACGACCTGCGACCGCATGG
TGGTGGGTGGAAAGTTCCGGCGGTATGGGATGGACCCGCGGCCTATCAGCTTGTGG
TGGGGTGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT
TGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGA
TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGTCGGCCGTGAAAACCTTCACGC
TTAACGTGGAGCCTGCGGTTCGATACGGGCAGACTTGAGTTCGGCAGGGGAGACTGGA
ATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGC
GGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTGCTAGGTGTGGGGGACTTCCAC
GTTCTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTA
ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCACCGGAAACCCATAGA
GATATGGGCCTCTTCGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG

ANNEXE

GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCGC
GTTATGGCGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGCA
CAGAGGGCTGCTAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCACAAAGCCGGTCTCAGTTCGG
ATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGC
AACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAA
GTCGGTAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCCGTAAGGGGGGAGCGGTCTGAAGGTG
GGACTGGCGAT

PUBLICATIONS

ANTIMICROBIAL SCREENING OF *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 AND EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON ANTIBIOTIC PRODUCTION

BAKOUR KERAMANE Leila^{1,2*}, BOUDJELLA Hadjira¹, MEKLAT Atika^{1,3},
BOURAS Noureddine^{1,4}, SABAOU Nasserline¹, MATHIEU Florence²

⁽¹⁾Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM)
Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algeria

⁽²⁾Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

⁽³⁾Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saâd Dahleb, Blida 1, Algeria

⁽⁴⁾Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre Université de Ghardaïa, Ghardaïa, Algeria

E-mail: h-boudjella@live.fr

(Received 21 November 2019 - Accepted 24 October 2020)

Abstract. - The Algerian Saharan actinobacterium *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947, exhibited an antagonist activity against Gram-positive bacteria, yeasts and filamentous pathogenic, toxigenic and phytopathogenic fungi. The antimicrobial potential of the strain was examined by PCR for the presence of type I and II of polyketide synthase (PKS) and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) gene clusters. The latter gene was detected, but the first two genes were absent. Production of antimicrobial (antifungal and antibacterial) activity was investigated by following kinetics in a semi-synthetic broth supplemented with various carbon and nitrogen sources. The highest activity was obtained with corn steep liquor and sucrose. Antimicrobial compounds were extracted from the culture filtrate. A strong activity was detected in the aqueous phase extract; however the activity in the organic extract was weak. The crude extracts were injected in HPLC for purification. Each fraction was tested for antimicrobial activity. The results revealed 7 active peaks in the aqueous extract, suggesting the presence of novel antibiotics.

Key words: *Saccharothrix tamanrassetensis*, antagonist activity, PCR, genes, carbon and nitrogen sources; production kinetics, HPLC.

CRIBLAGE ANTIMICROBIEN DE *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 ET EFFET DES SOURCES DE CARBONE ET D'AZOTE SUR LA PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES

Résumé. - L'actinobactérie saharienne algérienne *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 a montré une activité antagoniste contre les bactéries à Gram positif, les levures et les champignons pathogènes, toxigènes et phytopathogènes. Le potentiel antimicrobien de la souche est examiné par PCR pour la présence des types I et II de polyketide synthase (PKS) et du groupe de gènes non-ribosomal peptide synthetase (NRPS). Ce dernier gène a été détecté, mais les deux premiers gènes étaient absents. La production de l'activité antimicrobienne (antifongique et antibactérienne) a été étudiée en suivant des cinétiques en milieu semi-synthétique additionné de différentes sources de carbone et d'azote. L'activité la plus élevée est obtenue avec le corn steep liquor et le saccharose. Les composés antimicrobiens sont extraits à partir du filtrat de culture. Une forte activité antibiotique est détectée dans l'extrait de la phase aqueuse, en revanche l'activité de la phase organique est faible. Les extraits bruts sont injectés en HPLC pour purification. Chaque fraction a été testée pour l'activité antimicrobienne. Les résultats ont révélé la présence de 7 pics actifs dans l'extrait aqueux, suggérant la présence de nouveaux antibiotiques.

Mots clés: *Saccharothrix tamanrassetensis*, activité antagoniste, PCR, gènes, sources de carbone et d'azote, cinétiques de production, HPLC.

Introduction

There is clearly a need for new antimicrobials to combat resistant pathogens in serious and life-threatening diseases [1,2]. Microbial natural products continue to represent an important route to the discovery of new antimicrobial compounds [3]. Actinobacteria have proved to be important sources of industrially useful antibiotics [4,5]. In order to maximize the success rate of drug discovery using natural products, novel antibiotic screening strategies focused on rare actinobacteria strains that are isolated from extreme environments [6]. Many reports have shown that such strains demonstrated novelty and chemical diversity in the produced antibiotics. Microbial groups living under extreme conditions exhibit a variety of physiological and metabolic features allowing them to adapt to these particular environments. They possess a genetic diversity and specific secondary metabolite producing profiles for synthesizing novel antibiotics [6-8]. The Algerian arid soils, exposed to an arid climate, are special ecosystems that have been widely explored in our laboratory. A remarkable diversity of new species has been discovered; most of which showed a strong biosynthetic potential in producing novel antibiotics [9-17].

Since its first description [18], the rare genus *Saccharothrix* has been shown to produce a vast diversity of different bioactive secondary metabolites, including the antiviral agent fluvirucin from *Saccharothrix mutabilis* [19] and the antibacterial agent saccharomicin from *Saccharothrix espanaensis* [20].

The Algerian Saharan soils have been shown to be rich in species and strains of the *Saccharothrix* genus [21] including new species, such as *S. algeriensis* NRRL B-24137^T [22], *S. hoggarensis* DSM 45457^T, *S. saharensis* DSM 45456^T, *S. tamanrassetensis* DSM 45947^T [23-25], *S. isguenensis* DSM 46885^T and *S. ghardaiensis* DSM 46886^T [26,27]. The obtained promising results emphasize the need to continue the research into *Saccharothrix* antimicrobial compounds production. Furthermore, many researches have shown the ability of Saharan *Saccharothrix* strains to produce new or already known antibiotics, such as dithiolopyrrolones [28,29], anthracyclines [30] and chloramphenicol [31].

In this context, the new species *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947^T isolated from a Saharan soil sample, was investigated for its antimicrobial activity by the cylinder plating method and by screening the gene fragments of NRPS, PKS-I and PKS-II domains. Production, extraction and preliminary purification of antimicrobial compounds were also carried out.

1.- Material and methods

1.1.- The actinobacterial strain

Saccharothrix tamanrassetensis DSM 45947 was isolated in our laboratory from a soil sample collected from Tamanrasset (Hoggar region), in southern Algeria [6]. The strain was characterized taxonomically as a new species by BOUBETRA *et al.* (2013a) [23]. The strain was maintained as spore suspension in 25% glycerol at -20 °C.

1.2.- Antagonistic properties of *S. tamanrassetensis*

Antimicrobial screening was carried out using the cylinder plating method against a total of 40 different microorganism strains. The target tested strains were mostly human

pathogens or phytopathogens. They included seven Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* Ef B1, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 and *S. aureus* 639c); five Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91, *Acinetobacter baumannii* E16, *Escherichia coli* E52, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Agrobacterium tumefaciens* At2410); twenty filamentous fungi (*Fusarium solani* Fsol, *F. sporotrichioides* Fs, *F. culmorum* Fc1, *F. proliferatum* FprX20, *F. oxysporum* f. sp. *lini* Fol, *F. equiseti* Fe, *F. moniliforme* FmX22, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* Foa, *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* For1, *Penicillium expansum* Pe1, *P. glabrum* Pg1, *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829, *Aspergillus carbonarius* M333, *A. niger* OT304, *A. westerdijkiae* ATCC 3174, *A. parasiticus* CBS 100926, *A. flavus* Af3, *Trichoderma* sp. TdR1, *Alternaria* sp. AltX1 and *Botrytis cinerea* BcvX1); seven yeasts (*Candida albicans* IPA200, *C. albicans* IPA988, *C. tropicalis* CtY20, *C. glabrata* CgY21, *C. pseudotropicalis* CpsY22, *C. zeylanoides* CzY23 and *C. guilliermondii* CgY24) and a mycoplasma strain (*Ureaplasma parvum* ATCC 27813). The strains without an official accession number belong to our laboratory collection.

Cylinders were cut from 10 days old actinobacterium strain culture on ISP2 agar medium which were transferred, each one on a semi-solid ISP2 plate freshly seeded with a test strain. The plates were then incubated at 30°C and the diameters of the inhibition zones were measured after 24 h for the bacteria and 48 h for the yeasts and micro-fungi. All tests were conducted in triplicate \pm standard deviation (SD).

1.3.- DNA preparation and detection of PKS-I, PKS-II and NRPS sequences

Genomic potential for producing bioactive metabolites of *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 was evaluated. The strain was grown in 100 ml of ISP2 broth culture. Biomass was harvested by centrifugation for 10 mn (at 8000 rpm) and washed twice with double-distilled water. Chromosomal DNA was prepared using a DNA extraction kit (JetFlex, Germany).

The following specific degenerate primers were used to detect the genes encoding the polyketide synthetase I (PKS-I), polyketide synthetase II (PKS-II) and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) genes: PKS-I: K1F/M6R (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA3'/5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'; [32]; PKS-II: KS α /KS β (5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC3'/5'-TGGAANCCGCCGAABCCTCT-3' [33] and NRPS: A3F/A7R (5'-GCSTACSYSATSTACA CSTCSGG-3'/5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3' [32].

The 50 μ l PCR reaction mixture contained 20-40 ng of DNA template, 2 μ m of each primer, 0.4 μ m of dNTP mixture, 10 \times reaction buffer containing MgCl₂, 5% DMSO and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase. The PCR thermal cycling program comprised an initial denaturation at 98°C (for 4 mn), followed by 30 cycles comprising a denaturation step at 94°C (1 mn), an annealing step of 1 mn at 57.5°C with K1F/M6R, at 58°C with KS α /KS β , at 62°C with EdyA/EdyE and at 57°C with A3F/A7R and terminated with an extension step of 1 mn at 72°C. A final extension was performed at 72°C for 10 mn. All of the amplification products were separated by electrophoresis in an 0.8% agarose gel and bands of 1200-1400, 600 and 700-800 bp were classified as products of the PKS-I, PKS-II and NRPS genes, respectively.

1.4.- Selection of the optimal carbon and nitrogen sources

In order to investigate the effect of the nitrogen and carbon sources on the antimicrobial activity produced by *S. tamanrassetensis*, a basal semi-synthetic medium (SSM) was used. This medium, used for both pre-culture and production of antibiotics, consisted of (1 g/l of distilled water): NaCl 2.0, CaCl₂ 1.0, K₂HPO₄ 1.0, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄.7H₂O 0.2, FeSO₄.7H₂O 0.01, pH 7.2) [34].

For inoculum preparation, spore suspension of *S. tamanrassetensis* maintained in glycerol (25%) was transferred to ISP2 solid medium plates. After 10 days of incubation, the seed inoculation culture was prepared by using spore cakes as described by Ahsan et al. [35]. Two spore cakes (4 mm diameter), were transferred to a 250 ml flask containing 50 ml of the culture medium, then incubated under permanent agitation (250 rpm) at 30°C for 48 h. Aliquots 5% (v/v) of this seed culture were used to inoculate 100 ml of the fermentation medium contained in 500-ml Erlenmeyer flasks.

For the selection of the best nitrogen and carbon sources, twelve nitrogen sources and five carbon sources were investigated. The nitrogen sources included corn steep liquor (5% w/v); peptone, tryptone, casein, yeast extract, malt extract (0.25 % w/v), and arginine, valine, leucine, methionine, cystine and lysine at 0.05 % (w/v). These broths were supplemented with glucose (1%) as the carbon source. Carbon sources included glucose, sucrose, fructose and dextrin at 1% and sodium acetate at 0.1% (w/v). In these broths, corn steep liquor (5% v/v) was added as the nitrogen source. Final media pH was adjusted to 7.2. Cultures were incubated on a rotary shaker (250 rpm) at 30°C for 10 days. All results presented are mean values of three independent experiments.

1.5.- Antimicrobial assay

The antimicrobial activity of the collected culture filtrates was determined each 24 h using the agar well diffusion method against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c (MRSA) and *Umbelopsis ramanniana* NRRL1829 (UR). The bacterial suspension was prepared in sterile distilled water and adjusted as inoculum to a final concentration of 1.2×10^8 CFU/ml, while the micro-fungal suspension was adjusted to a final concentration of 0.4×10^6 CFU/ml [36]. Petri dishes were poured with Mueller-Hinton (for MRSA) or Sabouraud (for UR) agar (12 g/l agar) culture media, previously inoculated with each microbial suspension. Wells of 7 mm were cut out from the agar plates and filled with 100 µl of culture filtrate. The plates were incubated at 30°C after a diffusion process of 2 h at 4°C. The antibacterial and antifungal activities were evaluated by measuring the diameter of inhibition zones around the wells after 24 h of incubation for MRSA and 48 h for UR. Results are expressed as mean of triplicates and standard error of the mean.

1.6.- Production and extraction of antibiotics in the selected culture medium

Before culture productions, time course of pH, growth and antibiotic production was monitored in agitated 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the culture medium supplemented with the best carbon and nitrogen sources (250 rpm, 30°C, 10 days).

The antimicrobial activity was daily assayed against MRSA and UR, by the agar well diffusion method previously described. The pH values were measured with a pH

meter (HANNA instruments). Growth was measured as the dry cell weights (DCWs), with the method of PFEFFERLE *et al.* (2000) [37].

Four ml of homogenized culture broth were collected in sterile pre-weighed Eppendorf tubes and were centrifuged at 13000 rpm for 10 mn. The supernatant was recuperated for antimicrobial activity and pH measurements. The Eppendorf tube containing the pellet was used for measuring growth (by measuring the dry weight of the biomass). The pellet was washed three times with sterile distilled water. The Eppendorf tubes containing the pellets were dried at 105°C for 24 h, cooled in a desiccator, and weighed (KERN analytical balance). The results were expressed as g/l.

For the production of antibiotics, fermentations were carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the selected medium (250 rpm, 30 °C, 8 days). The extraction of active compounds was realized on the day of optimal production rate. The culture broths were centrifuged to remove the biomass and then filtered. The whole cell-free supernatant was extracted with an equal volume of dichloromethane. The organic and aqueous phases were recovered separately. The organic phase was dehydrated by passing through anhydrous sodium sulfate to remove residual traces of water and hydrophilic contaminants. This organic phase and the aqueous phase were concentrated to dryness and bioassayed against the indicator organisms (MRSA and UR) by the agar well diffusion method. The dry crude extracts were kept at -20°C for HPLC analysis.

1.7.- High performance liquid chromatography HPLC analysis

The active organic extract was dissolved in 1 ml of MeOH and subjected to semi-preparative HPLC purification on a Waters system using a reverse phase C18 column (200 mm × 10 mm, 5 µm) with a continuous linear gradient solvent system from 30 to 100% methanol in water during 40 mn (tab. I), a flow rate of 1 ml/mn, and UV detection at 220 and 260 nm. The fractions corresponding to peaks were collected, concentrated and then tested against MRSA and UR to detect the active fractions.

Table I.- HPLC program for organic extract purification

	Time (mn)	Methanol (solvent A %)	Water (solvent B %)
Pre-run	10	30	70
Run	0.00	30	70
	40	100	0
Post-run	50	100	0

The aqueous dry extract was recovered in minimum of ultrapure water and analyzed by HPLC using an amphiphilic Atlantis Prep T3 semi-preparative column (250 mm × 10 mm, 5 µm, Waters, Milford, MA) with a discontinuous gradient of methanol–water during 40 mn conforming to program in Table II, a flow rate of 1.5 ml/mn and UV detection at 220 and 254 nm. All the fractions were collected and tested against MRSA and UR.

Table II.- HPLC program for hydrophilic extract purification

	Time (mn)	Water (solvent A %)	Methanol (solvent B %)
Pre-run	10	100	0
	0.00	100	0
Run	22	25	75
	38	0	100
	40	100	0
Post-run	50	100	0

2.- Results

2.1.- Antimicrobial screening by the cylinder plating method

The antimicrobial activity of *S. tamanrassetensis* DSM 45947 by the cylinder plating method is shown in Table III. This strain was active against almost all target microorganisms, and the values of the inhibition diameters ranged from 5 to 25 mm. However, no activity was observed for four bacteria tested: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* Ef B1, *Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91 and *Escherichia coli* E52; and four yeasts tested: *Candida glabrata* CgY21, *C. albicans* IPA988, *C. albicans* IPA200 and *C. guilliermondii* CgY24; and four micro-fungi tested: *Fusarium solani* (Fsol), *F. sporotrichioides* (Fs), *F. proliferatum* FprX20 and *Aspergillus parasiticus* CBS 100926.

Table III.- Antimicrobial activity of *S. tamanrassetensis* DSM 45947 screened by using the cylinder plating method on ISP2 medium

Test microorganisms	Inhibition diameter (mm) ± SD
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 25923	18 ± 1.15
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	21 ± 2.40
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 639c	36 ± 1.15
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 25922	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	23 ± 0.67
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	15 ± 1.33
<i>Enterococcus faecalis</i> Ef B1	0
<i>Acinetobacter baumannii</i> E16	14 ± 0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 82.91	0
<i>Escherichia coli</i> E52	0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> At2410	15 ± 1.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13 ± 0.67
<i>Ureaplasma parvum</i> ATCC 27813	19 ± 0.67
<i>Candida tropicalis</i> CtY20	8 ± 4.00
<i>Candida glabrata</i> CgY21	0
<i>Candida albicans</i> IPA 988	0
<i>Candida albicans</i> IPA 200	0
<i>Candida pseudotropicalis</i> CpsY22	13 ± 0.67

<i>Candida zeylanoides</i> CzY23	13 ± 0.67
<i>Candida guilliermondii</i> CgY24	0
<i>Fusarium solani</i> Fsol	0
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Fs	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> Foa	12 ± 0.67
<i>Fusarium culmorum</i> Fc1	8 ± 4.0
<i>Fusarium proliferatum</i> FprX20	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> Fol	14 ± 1.15
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i> For1	8 ± 4.00
<i>Fusarium equiseti</i> Fe	13 ± 0.67
<i>Fusarium moniliforme</i> FmX22	15 ± 0.67
<i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829	29 ± 0.67
<i>Penicillium glabrum</i> Pg1	8 ± 4.00
<i>Penicillium expansum</i> Pe1	9 ± 4.37
<i>Aspergillus carbonarius</i> (M333)	17 ± 0.67
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> ATCC 3174	13 ± 0.67
<i>Aspergillus flavus</i> Af3	13 ± 0.67
<i>Aspergillus niger</i> OT304	8 ± 4.00
<i>Aspergillus parasiticus</i> CBS 100926	0
<i>Trichoderma</i> sp. TdR1	13 ± 0.67
<i>Alternaria</i> sp. (AltX1)	13 ± 0.67
<i>Botrytis cinerea</i> (BcvX1)	15 ± 0.67

The human pathogenic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c (MRSA) and the fungus *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (UR) are among the most sensitive target germs. They were selected as the indicator microorganisms for determining the antimicrobial activity in the subsequent experiments.

2.2.- Screening of genomic potential for antibiotic production

The antimicrobial biosynthetic gene diversity in *Saccharothrix tamanrassetensis* was examined by screening the presence of PKS-I, PKS-II and NRPS sequences using PCR. The results are shown in figure 1. NRPS gene was detected in *S. tamanrassetensis*; however, PKS-I and PKS-II were not detected. The bands observed on agarose gel at 750 bp indicated the presence of NRPS genes. This result reveals the antimicrobial potential of *S. tamanrassetensis*.

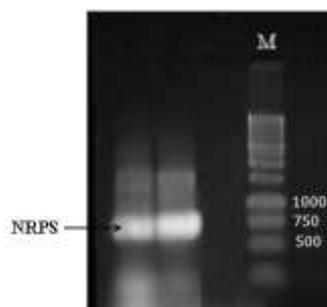


Figure 1.- Polymerase chain reaction analysis of *S. tamanrassetensis* DSM 45947 for PKS-I, PKS-II and NRPS
Test was conducted in duplicate. M: molecular weight marker (1 kb).

2.3.- Selection of the optimal carbon and nitrogen sources

The influence of nitrogen and carbon sources was studied in Erlenmeyer flasks. The results of antimicrobial activity production are illustrated in figure 2. Corn steep liquor (CSL) proved to be the best source for antimicrobial activity (24.0 mm and 22.0 mm) against UR and MRSA, respectively. This strong activity with CSL was followed by those obtained with peptone (24.0 mm and 21.0 mm) and yeast extract (22.0 mm). No antimicrobial activity was observed when the medium was supplemented with methionine, cystine or lysine. Corn steep liquor was retained as nitrogen source for the next kinetics.

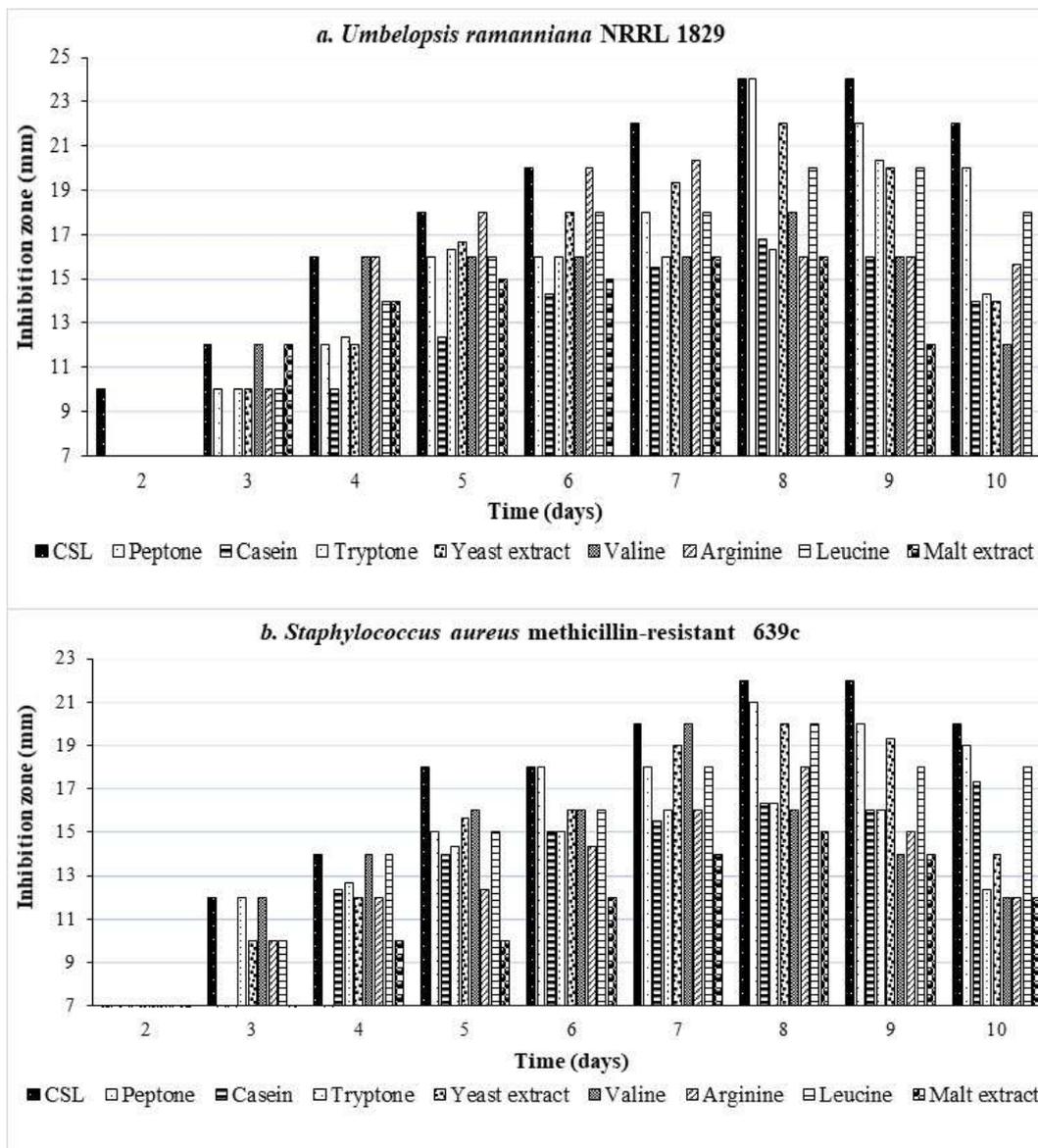


Figure 2 (a, b).- Influence of nitrogen sources on antibiotic production by *S. tamanrassetensis*. Medium supplemented with glucose at 1%.

The results of effect of carbon sources on antimicrobial activity are illustrated in figure 3. The highest antimicrobial activity was obtained in the presence of sucrose (32.0 mm and 28.0 mm), followed by fructose (28.0 mm and 24.0 mm) and glucose (22.0 mm

and 22.00 mm) against UR and MRSA, respectively. No or very weak activity production was noticed during cultivation in the presence of both dextrin and sodium acetate (≤ 16.0 mm). Sucrose is better than glucose as it is cheaper and do not cause catabolite repression. Thus, for the antibiotic production, sucrose and corn steep liquor were selected as carbon and nitrogen sources, respectively.

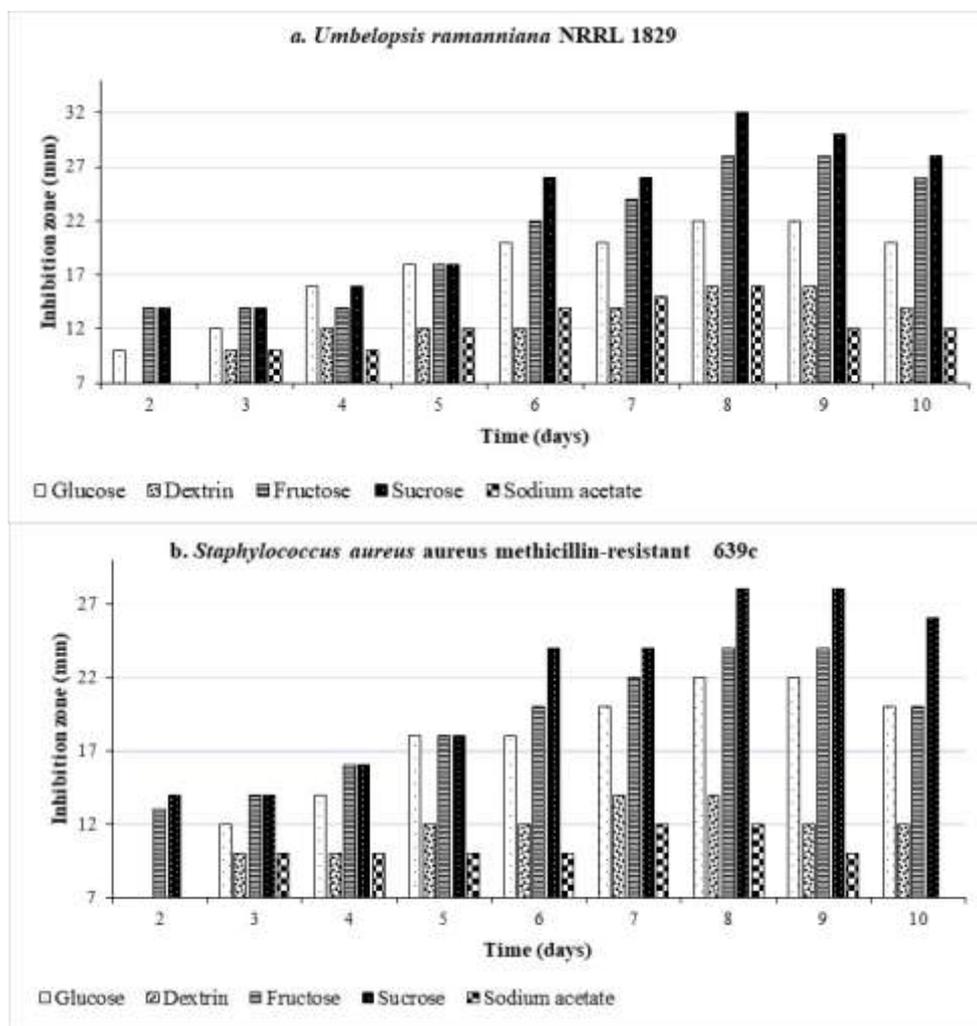


Figure 3 (a, b). - Influence of carbon sources on antibiotic production by *S. tamanrassetensis* Medium supplemented with corn steep liquor at 5%.

2.4.- Production of antibiotics in the selected culture medium

Time course of antibiotic production, pH and growth of *S. tamanrassetensis* was followed on the basal semi-synthetic medium supplemented with CSL (5%) and sucrose (1%). The antibacterial and antifungal activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c and *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 were detected after few hours of fermentation, and the maximum observed after 8 days of fermentation (fig. 4). The pH varied between 7.0 and 8.2 during 10 days of fermentation. The growth of *S. tamanrassetensis* was perfectly correlated to antimicrobial activity.

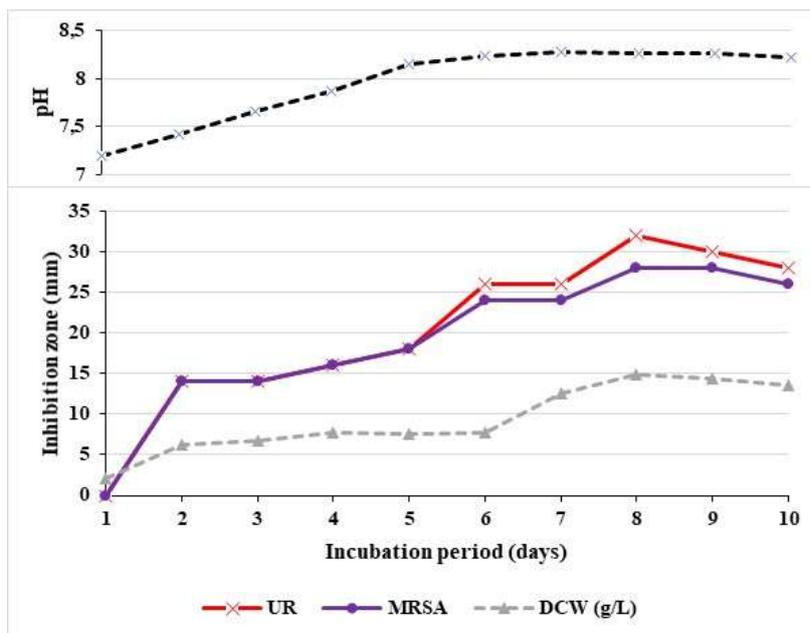


Figure 4.- Time course of growth, pH and antimicrobial activity (against MRSA and UR) on SSM supplemented with CSL and sucrose

For the production of antibiotics, *S. tamanrassetensis* was cultured during 8 days in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the selected medium. Active compounds were extracted with dichloromethane from 6l of cell-free culture filtrate. The organic and aqueous extracts were concentrated and assayed for antimicrobial activity against MRSA and UR.

The dichloromethane (organic) extract was yellow. Diameters of inhibition zones were 15 mm against UR and 17 mm against MRSA (wells of 7 mm in diameter are included).

The aqueous extract was brown. It was dissolved in ultrapure water and tested against target germs. The antimicrobial activities of the aqueous extract were more potent than that of the organic phase. Inhibition zones diameters were 20 mm for UR and 24 mm for MRSA (wells of 7 mm in diameter are included).

2.5.- Purification by high performance liquid chromatography (HPLC) and detection of biological activity

The yellow organic extract was dissolved in methanol and purified by high performance liquid chromatography (HPLC) in reverse phase column. The chromatogram of the first round of HPLC injection showed the presence of 16 main peaks numbered from 1 to 16 (fig. 5). Each main peak was collected separately and tested against UR and MRSA. The results of fraction color, retention time and antimicrobial activity were illustrated in table IV.

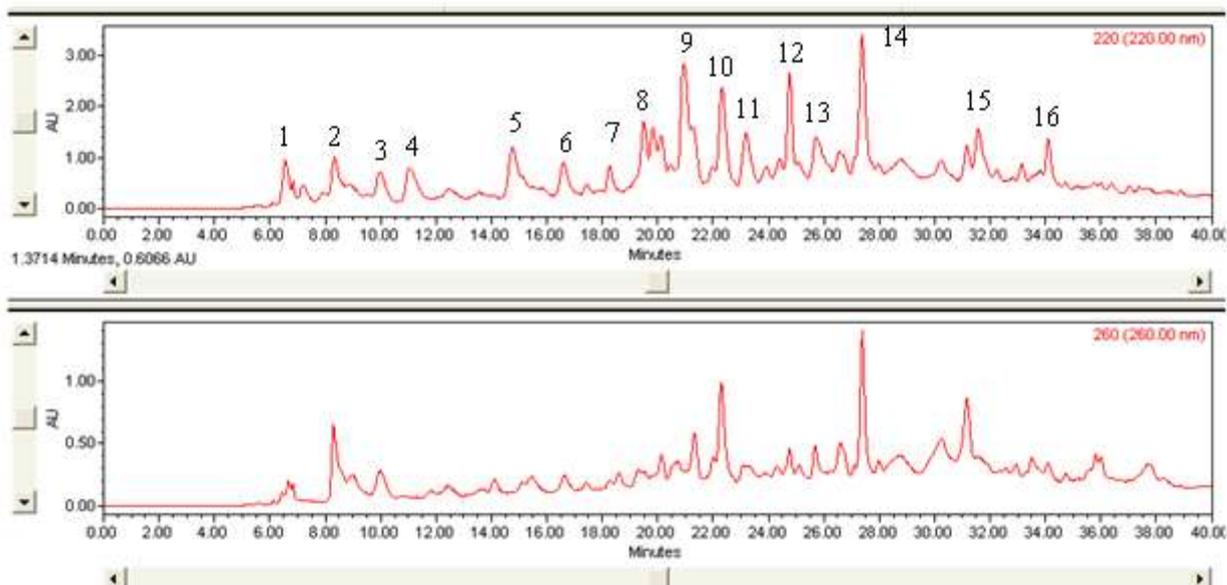


Figure 5.- HPLC profile of the first round of HPLC injection of the crude organic extract (C18 column, continuous linear gradient solvent system, detection at 220 and 260 nm)

Table IV.- Antimicrobial activities, retention times and colors of the main peaks obtained in the first HPLC injection of the organic extract

Peaks	Retention Time (mn)	Color	Antimicrobial activity (Inhibition diameter in mm)	
			MRSA*	UR**
1	6.60	Not colored	0	0
2	8.55	Not colored	0	0
3	10.02	Not colored	0	0
4	11.22	Not colored	0	0
5	14.75	Not colored	0	0
6	16.53	Not colored	0	0
7	18.14	Not colored	0	0
8	19.51	Not colored	0	0
9	20.90	Not colored	9	8.5
10	22.40	Not colored	10	9
11	23.19	Not colored	8.5	9
12	24.92	Not colored	11	11
13	25.75	Not colored	9	9
14	27.52	Pale yellow	12	11.5
15	31.50	Pale yellow	9	10
16	34.40	Pale yellow	8.5	9

Values of inhibition diameters include the diameter of the well (7 mm).

* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c; ** *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829.

The antimicrobial activity of the organic extract was detected in the fractions eluted between 20 to 34.40 mn. A moderate to weak activity was detected in fractions corresponding to peaks 12 (RT 24.92 mn) and 14 (RT 27.52 mn). A weak antibacterial and antifungal activity was detected in the peaks 9, 10, 13, 15 and 16, and no activity was

observed against MRSA and UR in the peaks 1 to 8.

The brown aqueous extract was dissolved in ultrapure water and purified by HPLC) in amphiphilic column. The chromatogram of the first round of HPLC injection showed the presence of eight main peaks numbered from A1 to A7 (A for aqueous) (fig. 6). Each main peak was collected separately and tested against UR and MRSA. The results of fraction color, retention time and antimicrobial activity were illustrated in table VI.

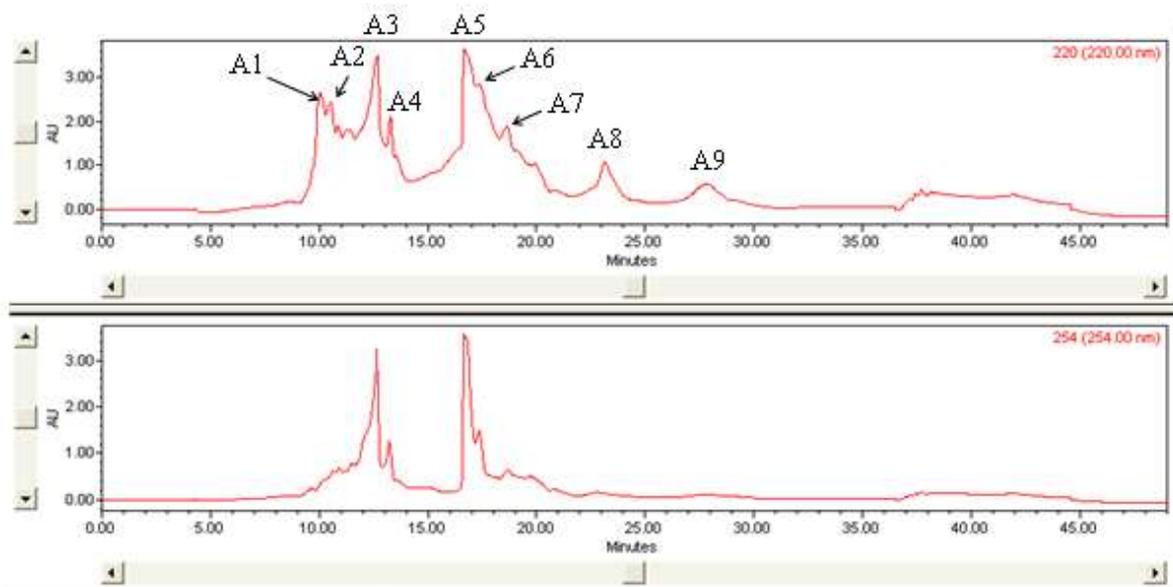


Figure 6.- HPLC profile of the first round of HPLC injection of the crude aqueous extract (amphiphilic column, discontinuous gradient solvent system, detection at 220 and 254 nm)

Table V.- Antimicrobial activities, retention times and colors of the main peaks obtained in the first HPLC injection of the aqueous extract

Peak	Retentions Time (mn)	Color	Antimicrobial activity (Inhibition distance in mm)	
			MRSA*	UR**
A1	9.89	Pale brown	12	42
A2	10.59	Pale brown	11	40
A3	12.63	Pale Yellow	14	0
A4	13.67	Yellow	0	0
A5	16.96	Pale Yellow	30	28
A6	17.31	Not colored	14	22
A7	18.55	Not colored	22	14
A8	23.13	Not colored	22	14
A9	27.57	Not colored	0	0

Values of inhibition diameters include the diameter of the well (7 mm).

* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c; ** *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829.

Strong biological activities are recorded against MRSA in the fractions A5 (RT 16.96 mn), A7 (RT 18.55 mn) and A8 (RT 23.13 mn). The A1 (42 mm), A2 (40 mm) and

A5 (28 mm) fractions exhibited very strong to strong antifungal activity. Each active fraction was active against both MRSA and UR, except for A3 (RT 12.63 mn) which was active only against MRSA. No activities were observed in fractions A4 (RT 13.67) and A9 (RT 27.57).

3.- Discussion

Several studies reported the production of various antimicrobial compounds by *Saccharothrix* strains isolated from Saharan soil samples, such as dithiolopyrrolones [28,29], anthracyclines [30] and chloramphenicol [31].

In the primary antimicrobial screening, *Saccharothrix tamanrassetensis* showed an interesting antimicrobial activity. This included the human pathogenic MRSA 639c, mycotoxigenic and plant pathogens. The increasing of antimicrobial resistance is of particular concern in medicine and public health, and has created a serious need to develop new antibiotics with novel mechanisms of action [1]. Many nosocomial pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Enterococcus* spp. exhibit resistance to multiple drug classes, making treatment a challenge [38,39]. The studied strain exhibited an antifungal activity against *Aspergillus carbonarius* and *A. westerdijkiae*, which are mycotoxigenic micro-fungi. They produce ochratoxin A, a dangerous toxin for humans and animals, that can cause poisoning, immune deficiency and cancer [40]. *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* are plant pathogens. The former is the agent of vascular wilt (fusariosis) of date palm and causes important deteriorations to the plant [41,42]. The latter is one of the most destructive diseases of tomatoes. These results reveal that *S. tamanrassetensis* could be considered as a potential promising candidate for production of novel antibiotics.

Further investigations on the antimicrobial activity screening of *S. tamanrassetensis* were devoted to the evaluation by PCR of the presence of genes encoding polyketide synthases (type I and II) and NRPS using primers for highly conserved regions encoding enzymes associated with biosynthesis of polyketides and peptides. A positive PCR amplification was obtained for NRPS. In contrast, PKS-I and PKS-II sequences were negative. Many antibiotics produced by actinobacteria have been biosynthesized through a pathway involving non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and/or polyketide synthases (PKS) [32,43-44]. The high frequency of NRPS genes in this actinobacterial strain may be evidence of the high potential of extremophilic actinobacteria to produce a large number of bioactive secondary metabolites [45]. Furthermore, the low occurrence of PKS-I genes in actinobacterial strains has been reported by several authors [45,46].

A lot of the genome mining methods are based on the detection of domains and protein families, well known to be involved in secondary metabolism such as NRPS and PKS [6,47]. The information obtained on the biosynthetic pathway involved in the production of a secondary metabolite can be used to predict the chemical structure of the resultant compound. Intensive research on these enzymes led to the identification and characterization of more than 23000 natural products of PKS and NRPS, which have been widely used in medicine as antibiotics and antitumor agents [3,48-52]. Soil actinobacteria are a potential source for novel PKSs and NRPs [53,54]. However, the PKS and NRPS biosynthetic genes of the Algerian Saharan soil strains are rarely reported. The NRPS gene detected in *S. tamanrassetensis* could be involved in the antibacterial and antifungal activities observed in this species against the target microorganisms, and suggested a

possibility for biosynthesis of peptide or polypeptide antibiotics.

Natural products biosynthesized by NRPSs are some of the most important drugs currently used clinically for the treatment of a variety of diseases. They included the most important antibacterial, antifungal, antiviral, immunosuppressant, and anticancer drugs [55]. Examples of NRPS antibiotics included capreomycin produced by *Saccharothrix mutabilis* subsp. *capreolus* strain ATCC 23892. It is used in human medicine as an antitubercular antibiotic, and is an essential component of the drug arsenal for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis [56]. Daptomycin is produced by *Streptomyces roseosporus* NRRL11379 and used for the treatment of skin infections caused by Gram-positive pathogens, including methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* [57,58], as well as the treatment of bacteremia and endocarditis [59]. The cyclosporins are another example of NRPS produced by the fungal species *Tolypocladium inflatum*, with cyclosporin A having the most interesting biological activities [60]. Initially investigated as a potential fungicide, cyclosporin A was later identified as a potent anti-inflammatory and immunosuppressant agent by suppressing T-lymphocyte activation [61]. This activity prompted its clinical use in transplant surgeries to prevent graft rejection and the treatment of autoimmune diseases [61,62]. Vancomycin and teichoplanin are glycopeptides and two clinically relevant drugs. Vancomycin, produced by the actinobacterium *Amycolatopsis orientalis*, is used against some methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, and is also used to treat serious infections and endocarditis caused by *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Corynebacterium* [63-65]. Teichoplanin, produced by the actinobacterium *Actinoplanes teichomyceticus*, is used for vancomycin-resistant enterococci [66]. The bleomycins are a family of glycosylated peptides that were found to have anticancer activities [67,68]. Future research in our laboratory is aimed at exploiting NRPS products of the new Saharan strain *S. tamanrassetensis* to the development and discovery of potential novel antibiotics.

Kinetics of antibiotic production by *S. tamanrassetensis* was initially studied by BOUBETRA *et al.* (2013a) [23]. These authors reported an antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and filamentous fungi, but not against yeasts. Time course of antibiotic production, growth and pH were monitored in ISP2 broth cultures. Purification and characterization of the antimicrobial products led to the identification of two new antibiotics purified from the organic extract. However, it is well known that antibiotic production depends considerably on culture conditions. The culture medium composition plays a major role in the biosynthesis of bioactive metabolites [69]. Minor changes in the type and concentration of carbon and nitrogen sources can affect antibiotic biosynthesis [70].

In this work, the authors proposed that selecting carbon and nitrogen sources in a basal semi-synthetic medium (SSM) can provide novel drug candidates. Corn steep liquor and sucrose were found to support maximum antimicrobial production. These nitrogen and carbon sources could be important sources for antibiotic biosynthesis in *S. tamanrassetensis*. CSL is a source of proteins, amino-acids, minerals, vitamins and microelements [71,72]. Our results were in agreement with many works in which, CSL is employed as a nitrogen source for secondary metabolite production. SARADA and SRIDHAR [73] found that CSL was the best source to enhance the production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus*. The same was observed by SHARMA *et al.* (2013) when using CSL among several agro-industrial wastes [74]. The pullulan produced by *Aureobasidium pullulans* RBF 4A3 was enhanced. The result obtained by addition of

sucrose agrees with those obtained by ELIBOL *et al.* (2004), THAKUR *et al.* (2009) and ISLAM *et al.* (2009) concerning antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2); *Streptomyces* sp. 201 and *Streptomyces albidoflavus*, respectively [75-77]. Sucrose was proved to be the optimal carbon source for enhancing of antifungal activity by *Xenorhabdus stockiae* PB09 [78].

The highest antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c and *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 were observed both after 8 days of fermentation. This means that the strain first grows to form a considerable amount of biomass followed by the production of secondary metabolites (antibiotics in this case). Fast growth actinobacterial strains produce antibiotics in the first days of fermentation. However, slower growth strains with a slow growth rate produce antibiotics during the last days of fermentations [79]. Detection of a strong activity in the aqueous extract suggests an hydrophilic nature of the produced antibiotics. Solvent extraction (with dichloromethane) appeared necessary, since it allowed the elimination of impurities, and therefore facilitated the purification by HPLC. The first injections of the crude aqueous extract in HPLC system allowed the detection of 7 compounds with strong to very strong biological activity.

In the previous studies on *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947, BOUBETRA *et al.* (2013a) used the ISP2 medium to characterize three new antibiotics from the organic extract [23]. The aqueous phase was also inactive. In our case, the semi-synthetic medium supplemented with CSL and sucrose was used for antibiotic production. HPLC results of the aqueous extract reveal the presence of seven active fractions. These results highlight the antimicrobial diversity of *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947, and encourage further investigations on the produced antibiotics.

Conclusion

Saccharothrix tamanrassetensis DSM 45947 exhibited strong antimicrobial potential. Analysis of biosynthetic genes for the production of antimicrobial compounds revealed the presence of NRPS, and therefore the possibility of producing peptides or polypeptides antibiotics. Testing of carbon and nitrogen sources in the semi-synthetic medium led to the selection of corn steep liquor and sucrose for the formulation of a medium favorable for an optimal antimicrobial activity production. Strong antibacterial and antifungal activities were produced in the selected culture medium. After solvent extraction of the active compounds, the strong activity remained in the aqueous phase. Preliminary HPLC purification revealed seven active products with strong to very strong antibacterial and antifungal activity. These results compared with that obtained by BOUBETRA *et al.* [23] suggest the presence of novel antibiotics. Final purifications and further chemical analyses of the bioactive compounds are recommended.

In memory of Professor Nasserine SABAOU (1956-2019)



Nasserdine SABAOU, a great scientist and specialist in Microbiology, has served as a professor at the Department of Natural Sciences of the “Ecole Normale Supérieure de Kouba, Algiers (Algeria)”, and was the former head of the “Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM)”. As researcher, his work mainly focused on systematic and antimicrobials of actinobacteria especially those of Saharan soils. Other interests included toxigenic fungi and mycotoxins. During his scientific career, he required clarity, accuracy, and honesty in scientific reporting. He was a role model for many of us. We were influenced for many years by his exceptional professional competence and his love for science.

As the instigator of this work, Professor SABAOU continuously provided advice and comments. His tireless follow-up and proofreading assisted us in producing this article. We are honored to dedicate this paper to his memory. *God Bless Him*.

References

- [1].- Mobarki NS., Almerabi BA. and Hattan AH., 2019.- Antibiotic resistance crisis. *IJMDC*, 3(6): 561-564. <https://doi.org/10.24911/IJMDC.51-1549060699>
- [2].- Ventola CL., 2015.- The antibiotic resistance crisis. Part 1: causes and threats. *P T*, 40(4): 277-283.
- [3].- Kat L. and Baltz R., 2016.- Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43(2-3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>.
- [4].- Genilloud O., 2017.- Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat. Prod. Rep.*, 34: 1203-1232. <https://doi.org/10.1039/C7NP00026J>
- [5].- Genilloud O., 2018.- Mining Actinomycetes for Novel antibiotics in the omics Era: Are We Ready to Exploit This New Paradigm? A review. *Antibiotics*, 7:(4) 85 <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040085>
- [6].- Baltz RH., 2017.- Molecular beacons to identify gifted microbes for genome mining. *J. Antibiot.*, 70(5): 639–646 . <https://doi.org/10.38/ja.2017.1>
- [7].- Rateb ME., Ebel R., and Jaspars M., 2018.- Natural product diversity of actinobacteria in the Atacama Desert. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111(8):1467-1477. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1030-z>
- [8].- Mohammadipanah F. and Wink J., 2016.- Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. *Front. Microbiol.*, 6:1541. <http://dx.doi.10.3389/fmicb.2015.01541>
- [9].- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Lefèbvre G. and Germain P., 1998.- Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, 9: 147–153.
- [10].- Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje MC., Sabaou N., Lebrihi A.,

- 2010.- Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. J. Antibiot. (Tokyo), 63: 709-711. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.111>
- [11].- 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: 6710-6714. <https://doi.org/10.1128/AEM.00326-11>
- [12].- Mokrane S., Bouras N., Sabaou N., Mathieu F., 2013.- Actinomycetes from saline and non-saline soils of Saharan palm groves: taxonomy, ecology and antagonistic properties. Afr. J. Microbiol. Res., 7: 2167-2178.
- [13].- Aouiche A., Bouras N., Mokrane S., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP., 2015.- *Actinokineospora mzabensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. Antonie Van Leeuwenhoek, 107: 291-296). <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0328-8>.
- [14].- Boudjelal F., Bouras N., Schumann P., Sabaou N., Spröer C., Zitouni A., and Klenk, HP., 2015.- *Actinoalloteichus hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 65(6): 2006–2010. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000216>
- [15].- Saker R., Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Schumann P., Sproer C., Sabaou N. & Klenk HP., 2015a.- *Prauserella isguenensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from desert soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 65: 1598–1603.
- [16].- Saker, R., Bouras, N., Meklat, A., Zitouni, A., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H.P., Sabaou, N., 2015b.- *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from northern Sahara. Curr. Microbiol., 70: 423–428.
- [17].- Chaabane Chaouch, F., Bouras, N., Mokrane, S., Zitouni, A., Schumann, P., Spröer, C., Sabaou, N., Klenk, HP., 2016b.- *Streptosporangium saharense* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 66: 1371–1376.
- [18].- Labeda DP., Testa RT., Lechevalier MP., Lechevalier HA., 1984.- *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiosis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 34: 426–431.
- [19].- Tomita K., Oda N., Hoshino Y., Ohkusa N., Chikazawa H., 1991.- Fluvirucins A1, A2, B1, B2, B3, B4 and B5, new antibiotics active against influenza A virus. IV. Taxonomy on the producing organisms. J. Antibiot., 44 (9): 940-948. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.44.940>
- [20].- Singh MP., Petersen PJ., Weiss WJ., Kong F., Greenstein M., 2000.- Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. Antimicrob. Agents Chemother., 44: 2154-2159.

- [21].- Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N., 2005.- *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Res. Microbiol., 156: 984-993. [https:// doi.org/10.1016/j.resmic.2005.05.006](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.05.006)
- [22].- Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2004a.- Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. J. Antibiot. (Tokyo), 57: 367-372. [https:// doi.org/10.7164/antibiotics.57.367](https://doi.org/10.7164/antibiotics.57.367)
- [23].- Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A., Mathieu F., 2013a.- Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. Microbiol. Res., 168: 223–230.
- [24].- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P.C., Klenk H.P., Sabaou N., 2013b.- *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 63: 549–55.
- [25].- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P., Sabaou N., 2015.- *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 65: 1316–1320. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000104>
- [26] Bouznada K., Bouras N., Mokrane S., Chaouch F.C., Zitouni A., Pötter G., Spröer C., Klenk H-P., Sabaou N., 2016.- *Saccharothrix isguenensis* sp. nov, an actinobacterium isolated from desert soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 66: 4785–4790.
- [27].- Bouznada K., Bouras N., Mokrane S., Chaouch F.C., Zitouni A., Pötter G., Spröer C., Klenk H.P., Sabaou N., 2017.- *Saccharothrix ghardaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. Antonie Van Leeuwenhoek, 110: 399–405.
- [28].- Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2008.- Precursor directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Process Biochem. 43: 1244-1252. [https:// doi.org/10.1016/j.procbio.2008.07.008](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.07.008)
- [29].- Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2011.- New dithiolopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. FEMS Microbiol. Lett., 318: 41-46. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02246.x>.
- [30].- Zitouni A., Mathieu F., Coppel Y., Pont F., Sabaou N. and Lebrihi A., 2004b.- Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. J. Antibiot., 57: 373-378.
- [31].- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F., Lebrihi A., 2012.- *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol producing strain isolated from a Saharan soil. World J. Microbiol. Biotechnol., 28 (3): 943-951.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-0892-2>

- [32].- Ayuso-Sacido A., Genilloud O., 2005.- New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol.*, 49: 10–24.
- [33].- Metsä-Ketelä M., Salo V., Halo L., Hautala A., Hakala J., Mäntsälä P., Ylihonko K., 1999.- An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 180: 1–6.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08770.x>
- [34].- Strub C, Brandam C, Meyer X, Lebrihi A., 2008.- Investigations on *Saccharothrix algeriensis* growth on synthetic media. *J. Biosci. Bioeng.*, 106: 148-153.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.010>
- [35].- Ahsan T., Chen J., Zhao X., Irfan M., Wu Y., 2017.- Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. *AMB Express*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0351-z>
- [36].- EUCAST., 2018.- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. www.eucast.org. Site Web visited in November 2018.
- [37].- Pfefferle C., Theobald U., Gürtler H., Fiedler H., 2000.- Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, 80: 135-142.
- [38].- Appelbaum PC., 2012.- 2012 and beyond: potential for the start of a second pre-antibiotic era? *J. Antimicrob. Chemother.*, 67(9): 2062–2068.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks213>
- [39].- Boucher HW., Talbot GH., Benjamin DK Jr., Bradley J., Guidos RJ., Jones RN, Murray BE., Bonomo RA., Gilbert D., 2013.- 10 x '20 Progress-development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 56(12): 1685–1694. <https://doi.org/10.1093/cid/cit152>
- [40].- Da Rocha MEB., Freire FCO., Maia FEF., Guedes MIF., Rondina D., 2014.- Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36: 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- [41].- El Modafar C., 2010.- Mechanisms of date palm resistance to bayoud disease: current state of knowledge and research prospects. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 74: 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.06.008>
- [42].- Benzohra IE., Megateli M., Berdja R., 2015.- Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management. *Afr. J. Biotechnol.*, 14: 542-550. <https://doi.org/10.5897/AJBX2014.14292>

- [43].- Gontang EA., Gaudencio SP., Fenical W., Jensen PR., 2010.- Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 2487– 2499.
- [44].- Janso J.E., Carter G.T., 2010.- Biosynthetic potential of phylogenetically 594 unique endophytic. Actinomycetes from tropical plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 4377–4386
- [45].- Saker R., Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N., 2015.- Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. *Ann. Microbiol.*, 65(4): 2241–2253. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1065-6>
- [46].- Qin S., Li J., Chen HH., Zhao GZ., Zhu WY., Jiang CL., Xu LH., Li WJ., 2009.- Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rainforests, Xishuangbanna: China. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(19): 6176-6186.
- [47].- Nikolouli K., Mossialos D., 2012.- Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnol. Lett.*, 34(8): 1393–1403. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0919-2>
- [48].- Amoutzias GD., van de Peer Y., Mossialos D., 2008.- Evolution and taxonomic distribution of nonribosomal peptide and polyketide synthases. *Future Microbiol.*, 3: 361–370. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.3.361>.
- [49].- Clardy J., Fischbach M., Walsh C., 2006.- New antibiotics from bacterial natural products. *Nat. Biotechnol.*, 24: 1541–1550. <https://doi.org/10.1038/nbt1266>
- [50].- Finking R., Marahiel M., 2004.- Biosynthesis of nonribosomal peptides 1. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58: 453-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123615>.
- [51].- Demain A. L., Sanchez S., 2009.- Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 62: 5-16. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>
- [52].- Newman, D. J., Cragg, G. M., 2012.- Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75(3): 311–335. <https://doi.org/10.1021/np200906s>
- [53].- Fenical W., Jensen PR., 2006.- Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.*, 2: 666-673.
- [54].- Bull AT., and Stach JE., 2007.- Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.*, 15: 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.004>
- [55].- Felnagle EA., Jackson EE., Chan YA., Podevels AM., Berti AD., McMahon MD., Thomas MG., 2008.- Nonribosomal peptide synthetases involved in the production

of medically relevant natural products. *Mol. Pharm.*, 5(2): 191–211.
<https://doi.org/10.1021/mp700137g>

- [56].- Felnagle E. A., Rondon M. R., Berti A. D., Crosby H. A., Thomas M. G., 2007.- Identification of the biosynthetic gene cluster and an additional gene for resistance to the antituberculosis drug capreomycin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(13): 4162–70.
- [57].- Kirkpatrick P., Raja A., LaBonte J., Lebbos J., 2003.- Daptomycin. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2(12): 943–944.
- [58].- Baltz RH., Brian P., Miao V., Wrigley SK., 2006.- Combinatorial biosynthesis of lipopeptide antibiotics in *Streptomyces roseosporus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33(2): 66–74.
- [59].- Fowler V. G., Jr., Boucher H. W., Corey G. R., Abrutyn E., Karchmer A. W., Rupp M. E., Levine D. P., Chambers H. F., Tally F. P., Vigliani G. A., Cabell C. H., Link A. S., DeMeyer I., Filler S. G., Zervos M., Cook P., Parsonnet J., Bernstein J. M., Price C. S., Forrest G. N., Fatkenheuer G., Gareca M., Rehm S. J., Brodt H. R., Tice A., Cosgrove S. E., 2006.- Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.*, 355(7): 653–665.
- [60].- Dreyfuss M., Harri E., Hoffmann H., Kobel H., Pache W., Tschertter H., 1976.- Cyclosporin A and C; New metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 3: 125–133.
- [61].- Borel JF., Feurer C., Gubler HU., Stahelin H., 1976.- Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, 6(4): 468–475.
- [62].- Morris PJ., 1984.- The impact of Cyclosporin A on transplantation. *Adv. Surg.*, 17: 99–127.
- [63].- Williams DH., 1996.- The glycopeptide story - How to kill the deadly ‘superbugs’. *Nat. Prod. Rep.*, 13(6): 469–477.
- [64].- Nicas TL, Cooper RDG., 1997.- Vancomycin and other glycopeptides. In: Strohl WR, editor. *Biotechnology of antibiotics*, vol. 82: 363–392.
- [65].- Mookadam F., Cikes M., Baddour LM., Tleyjeh IM., Mookadam M., 2006.- *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: a systematic overview spanning four decades. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 25(6): 349–353.
- [66].- Kahne D., Leimkuhler C., Lu W., Walsh C., 2005.- Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem. Rev.*, 105(2): 425–448.
- [67].- Umezawa H., 1965.- Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5: 1079–1085.
- [68].- Umezawa H., Maeda K., Takeuchi T., Okami Y., 1966.- New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.*, 19(5): 200–209.

- [69].- Rafieenia, R., 2013.- Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomyces*. Asian J. Pharm. Sci., 3(3): 810-821.
- [70].- Singh V., Haque S., Niwas R., Srivastava A., Pasupuleti M., Tripathi CKM., 2017.- Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. Front. Microbiol., 7: 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- [71].- Pereira FB., Guimarães PMR., Teixeira JA., Domingues L., 2010.- Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. Bioresour. Technol., 101: 7856-7863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.082>.
- [72].- Xiao Y., Zhang X., Zhu M., Tan W., 2013.- Effect of the culture media optimization, pH and temperature on the biohydrogen production and the hydrogenase activities by *Klebsiella pneumoniae* ECU-15. Bioresour. Technol., 137: 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.109>
- [73].- Sarada I., Sridhar P., 1998.- Nutritional improvement for cephamycin C fermentation using a superior strain of *Streptomyces clavuligerus*. Process Biochem., 33: 317-322. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00086-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00086-1).
- [74].- Sharma N., Prasad GS., Choudhury AR., 2013.- Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. Carbohydr. Polym., 93: 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.059>.
- [75].- Elibol M., 2004.- Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology. Process Biochem., 39: 1057-1062. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00232-2)
- [76].- Thakur D., Bora TC., Bordoloi GN., 2009.- Mazumdar S Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. J. Myc. Med., 19: 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2009.04.001>
- [77].- Islam MR., Jeong YT., Ryu YJ., Song CH., Lee YS., 2009.- Isolation, identification and optimal culture conditions of *Streptomyces albidoflavus* C247 producing antifungal agents against *Rhizoctonia solani* AG2-2. Mycobiology, 37: 114-120. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.2.114>
- [78].- Sa-uth C., Rattanasena P., Chandrapatya A., Bussaman P., 2018.- Modification of medium composition for enhancing the production of antifungal activity from *Xenorhabdus stockiae* PB09 by using response surface methodology. Int. J. Microbiol., 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/3965851>
- [79].- Lahoum A., Aouiche A., Bouras N., Verheecke-Vaessen C., Klenk HP., Sabaou N., Mathieu F., 2016.- Antifungal activity of a Saharan strain of *Actinomadura* sp. ACD1 against toxigenic fungi and other pathogenic microorganisms. J. Myc. Med., 26: 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.02.017>.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/352863632>

Optimization of medium components to improve the antimicrobial activity of a new Saharan actinobacterial strain *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947

Article in *Research Journal of Biotechnology* · July 2021

CITATIONS

0

READS

12

4 authors:



Leila Bakour

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

2 PUBLICATIONS 1 CITATION

[SEE PROFILE](#)



Boudjella Hadjira

École Normale Supérieure de Kouba

22 PUBLICATIONS 470 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Noureddine Bouras

Université de Ghardaia

206 PUBLICATIONS 1,009 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Florence Mathieu

Institut National Polytechnique de Toulouse

264 PUBLICATIONS 4,737 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Endophytic actinobacteria [View project](#)



Mycotoxins in Algerian food and feed. Occurrence and Control strategies [View project](#)

Optimization of medium components to improve the antimicrobial activity of a new Saharan actinobacterial strain *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947

Bakour Keramane Leila^{1,2*}, Boudjella Hadjira¹, Bouras Noureddine^{1,3} and Mathieu Florence²

¹ Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, ALGERIA

² Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, FRANCE

³ Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455 Ghardaïa 47000, ALGERIA

*leilabakour@yahoo.fr; l.bakour@ensv.dz

Abstract

Saccharothrix tamanrassetensis DSM 45947 previously isolated from a Saharan soil sample and characterized as a new species, was found to be a potential candidate in the search for novel antibiotics. The strain was found to exhibit a strong antimicrobial activity against a wide range of bacteria and fungi. In this study, statistical methods were applied to optimize the fermentation medium for enhanced antimicrobial activity production. A basal medium supplemented with sucrose and corn steep liquor was used as the original medium for optimization experiments.

Plackett-Burman design showed that sucrose, corn steep liquor and KH_2PO_4 , were recognised to have significant effect on antimicrobial activity production. Response surface methodology with Box-Behnken design determined the optimal concentrations. Optimal values for maximum antibiotic production were as follows: 7 g L^{-1} of sucrose, 52 g L^{-1} of corn steep liquor and 0.9 g L^{-1} of KH_2PO_4 . Under these conditions, antimicrobial activities of DSM 45947 showed a global increase by 32% against the bacterium methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and 36% against the fungus *Umbelopsis ramanniana*. This study provided an economical and efficient method to cultivate *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 for enhanced antimicrobial activity production.

Keywords: *Saccharothrix tamanrassetensis*, antimicrobial activity, fermentation, optimization, production.

Introduction

New antimicrobial agents are urgently needed to combat frequently emerging multi drug resistant pathogens³⁰. Several approaches were developed for the screening of new antibiotics and they targeted microbial secondary metabolites²⁰.

Actinobacteria are well known as the most important source of antibiotics, pre-dominantly the genus *Streptomyces*^{11,17}. The screenings of rare actinobacteria isolated from extreme environments demonstrated a chemical diversity and novelty in the produced antibiotics^{3,8}. The rare actinobacteria

obtained from the Algerian Saharan soils showed a great diversity of species with a remarkable potential in the production of novel antibiobiotics⁸.

In this context, *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947^T (=DSM 45947^T=CECT 8640^T), a new Saharan actinobacterium species³ was found to possess an interesting antimicrobial potential and was selected for further study. In ISP2 complex medium, it produced small quantities of three new antibiotics with antibacterial and antifungal activity². However, high product yields are necessary to achieve the characterization of their biological activities. Medium optimization is still one of the most critically investigated experiments that was carried out before any largescale metabolite production. Enhanced antimicrobial productivity can be achieved by manipulating the nutritional and physical parameters of the culture conditions³³. It is commonly known that the nature and concentration of the nutrients in the fermentation medium, particularly carbon and nitrogen sources, as well as cultural conditions, are crucial in the production of secondary metabolites by microorganisms³³.

Optimization experiments are usually performed using non-statistical and statistical experimental design methods^{22,33}. The former method involves the testing of one factor (or variable) at a time instead of all factors simultaneously. In this classical approach, selection of the best carbon or nitrogen source can be done by changing one independent variable while maintaining all others at a fixed level. This method requires a multitude of experiments and does not acknowledge the interaction between the different variables²⁹. However, statistical experimental design techniques are widely used to select and determine optimal levels of the significant variables with the advantage to apprehend the simultaneous effect of several variables. The application of these statistical approaches in media optimization can result in improved product yields and reduced process variability, time and number of experiments¹⁹.

In this work, an attempt was made to enhance the antimicrobial activity of *S. tamanrassetensis* DSM 45947 by using statistical optimization approaches in a basal culture medium. The statistical methods analyzed the influential variables in the medium by using the Plackett-Burman design (PBD) and found the optimal concentrations of the screened variables and their interactions by using the Box-

Behnken design (BBD) and Response Surface Methodology (RSM).

Material and Methods

Organism and preliminary determination of antimicrobial properties: *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 was isolated from a Saharan soil sample collected from Tamanrasset (Hoggar region), in southern Algeria². This actinobacterium was identified as a new species by Boubetra et al³ with DSM 45947^T as the type strain. The strain was maintained at 4 °C on agar slants of International *Streptomyces* Project medium 2 (ISP2)³².

In order to select the target microorganisms for the optimization experiments, the antimicrobial activity of strain DSM 45947 was screened against a panel of bacterial and fungal strains using the agar cross streak method. The actinobacterium was inoculated on ISP2 medium plates by a single streak and incubated at 28°C for 10 days. After good growth, the plates were inoculated with the target microorganisms by a single streak, perpendicular to the actinobacterium one. After 24 h incubation for bacteria and 48 h for fungi, the microbial antagonism was analyzed by measuring the inhibition distance between the target microorganisms and the *S. tamanrassetensis* DSM 45947 strain colony margin. All tests were conducted in triplicate.

The target tested strains were mostly human pathogens or phytopathogens. They included seven gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus* sp., *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 and *S. aureus* 639c), five gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* E52, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Agrobacterium* sp.), twenty filamentous fungi (*Fusarium solani*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, *Penicillium expansum*, *P. glabrum*, *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829, *Aspergillus carbonarius* M333, *A. niger* OT304, *A. westerdijkiae*, *A. parasiticus* CBS 100926, *A. flavus* NRRL 3251, *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp. and *Botrytis cinerea*), seven yeasts including *Candida albicans* IPA200, *C. albicans* IPA988, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. zeylanoides* and *C. guilliermondii*) and a mycoplasma strain (*Ureaplasma parvum* ATCC 27813). The strains without an accession number belong to our laboratory collection.

Medium and culture conditions: The culture medium used for preculture and production fermentations consisted of in (in g L⁻¹): NaCl 2.0; CaCl₂ 1.0; K₂HPO₄ 1.0; KH₂PO₄ 0.5; MgSO₄·7H₂O 0.2; FeSO₄·7H₂O 0.01 at pH 7.2³⁵ supplemented with 5% (w/v) of corn steep liquor and 1% (w/v) of sucrose. Corn steep liquor and sucrose included in the medium composition were selected as nitrogen and

carbon sources respectively during preliminary experiments in which various carbon and nitrogen sources were evaluated for their effects on antimicrobial activity production by *S. tamanrassetensis* DSM 45947 (data not shown).

The preculture was prepared by using spore cakes as described by Wang et al⁴⁰. From a fresh culture of DSM 45947 strain grown on ISP2 agar for 10 days at 28°C, two spore cakes (4 mm diameter) were transferred to a 250 mL-Erlenmeyer flask containing 50 mL of the culture medium, then incubated under permanent agitation (250 rpm) for 48 h at 30°C. Aliquots 5% (v/v) of this preculture were used to inoculate 100 mL of the fermentation medium contained in 500 mL Erlenmeyer flasks.

Antimicrobial assay: The antimicrobial activity was evaluated by the conventional agar well diffusion method against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c (MRSA) and *Umbelopsis ramanniana* (UR). Bacterial and fungal suspensions were adjusted as inoculum to a final concentration of 1.2 × 10⁸ CFU mL⁻¹ and 0.4 × 10⁶ CFU mL⁻¹ respectively. Mueller-Hinton (for the bacterium) or Sabouraud (for the fungus) agar plates were inoculated with the corresponding microbial suspension. Wells of 7 mm diameter were aseptically bored into the agar plates and 100 µL of the culture supernatant were loaded in each well.

The antimicrobial activities were evaluated by measuring the diameter of translucent inhibition zones around the wells after 24 and 48 h of incubation for the bacterium and the fungus respectively. Results are expressed as mean of triplicate and standard error of the mean.

Evaluation of factors affecting the antimicrobial activity using Plackett-Burman design: This step aimed to identify the most suitable factors influencing the antimicrobial activity of DSM 45947 strain using Plackett-Burman design (PBD)²⁸. In this study, seven variables were screened including sucrose and CSL as well as five process variables (NaCl, CaCl₂, K₂HPO₄, KH₂PO₄ and incubation time). Each variable was tested at two levels, high (+1) and low (-1) and involved in 12 trials. The media components, the codes and the level (low or high) of the variables are shown in table 1. The twelve-culture media were prepared according to the experiment design matrix given in table 2 where each row represents a trial and each column represents an independent variable.

All experiments were performed in triplicate and the average antimicrobial activity against MRSA and UR was noted as the response. The PB plan design was based on the first order model as follows:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 \quad (1)$$

where *Y* is the predicted antimicrobial activity, β_0 is the constant coefficient, β_1 - β_7 are linear coefficients and *X*₁-*X*₇

are the independent variables. Using student's t-test, each variable with a significant effect on the antimicrobial activity has a confidence level higher than 95%.

The effect of each factor was determined by the following equation:

$$E_{(xi)} = 2 (\sum P_{i+} - \sum P_{i-}) / N \quad (2)$$

where $E_{(xi)}$ is the effect of the tested variable, P_{i+} and P_{i-} are the response from trials where the variable (X_i) is present in high and low level respectively and N is the number of trials. Minitab 17.0 software (Inc., PA, USA) was used for the experimental designs and subsequent analyses of the experimental data.

Optimization of significant variables by Response surface methodology: Response surface methodology (RSM) via Box-Behnken design (BBD) was employed to optimize the selected medium constituents, corn steep liquor, sucrose and K_2HPO_4 . The three critical factors were investigated at three levels low (-1), middle (0) and high (+1) and their codes used in BBD are given in table 3. The rest of the factors were kept at the same level as in the basal

medium. A 17-run experiment was designed based on factorial BBD, with five replicates at the central point and the values represent the mean of two repetitions (Table 3).

In order to predict the optimal point, the mathematical relationships between the responses (Y) and the independent variables (A , B and C) were described by the following second-order-polynomial equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} CB \quad (3)$$

where β_0 is intercept, β_1 , β_2 and β_3 are linear coefficient; β_{11} , β_{22} and β_{33} are quadratic coefficients and β_{12} , β_{13} and β_{23} are the interaction coefficients.

The statistical analysis of the model was performed by evaluating the lack of fit, ANOVA, Fisher's F-test and its associated P (F) and t-values. The statistical software Minitab 17.0 was used to generate a regression model for predicting the optimum combinations and the experimental levels of each variable. This regression equation was illustrated graphically by two-dimensional (2D) contour plots.

Table 1
Codes variables and levels used in PBD

Variables	Medium components	High values (g L ⁻¹)	Low values (g L ⁻¹)
X ₁	Sucrose	15	5
X ₂	K ₂ HPO ₄	1.5	0.5
X ₃	CaCl ₂	1.5	0.5
X ₄	NaCl	3.5	0.5
X ₅	Corn steep liquor	70	30
X ₆	Incubation time	12 days	8 days
X ₇	KH ₂ PO ₄	0.7	0.3

Table 2
Plackett-Burman design matrix for seven variables with responses

Trial n ^o	Variables levels							Antimicrobial activity (Inhibition zone in mm ± sem ^a)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	MRSA ^b	UR ^c
1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	13 ± 1	0
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	17 ± 1	17 ± 1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	14 ± 0	11 ± 1
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0
5	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	18 ± 1.15	16 ± 0
6	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	15 ± 1	10 ± 1
7	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	17 ± 1	13 ± 1
8	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	10 ± 0	9 ± 1
9	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	15 ± 0.67	11 ± 1
10	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	11 ± 0.67	8 ± 0
11	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	19 ± 0.67	15 ± 1
12	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	16 ± 0	11 ± 2

^a Standard error of the mean; ^b Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c; ^c *Umbelopsis ramanniana* (NRRL 1829)

Table 3
Box-Behnken design of influencing variables (coded) and their responses

Run	Factors			Inhibition zone (mm)					
	A	B	C	Observed		Predicted		Residuals	
	CSL ^a	Sucrose	KH ₂ PO ₄	Y _{MRSA} ^b	Y _{UR} ^c	Y _{MRSA}	Y _{UR}	Y _{MRSA}	Y _{UR}
1	0	0	0	24.5	16	25.04	19.60	-0.54	-3.60
2	0	0	0	24.5	19	25.04	19.60	-0.54	-0.60
3	0	0	0	25.5	20	25.04	19.60	0.46	0.40
4	-1	-1	0	14	0	11.15	2.06	2.85	-2.06
5	1	0	1	19	14	14.16	15.57	4.84	-1.57
6	1	-1	0	16	16	17.15	15.57	-1.15	0.43
7	0	1	1	20	18	22.04	18.51	-2.04	-0.51
8	1	0	-1	0	9	0.92	9.94	-0.92	-0.94
9	0	-1	-1	14	9	12.04	8.50	1.96	0.50
10	0	0	0	24.5	19	25.04	19.60	-0.54	-0.60
11	-1	0	1	20	16	19.15	15.07	0.85	0.93
12	-1	1	0	19	8	17.93	8.44	1.07	-0.44
13	-1	0	-1	0	0	4.93	-1.56	-4.93	1.56
14	1	1	0	0	9	2.93	6.94	-2.93	2.06
15	0	-1	136	25.5	23.5	29.27	22.38	-3.77	1.12
16	0	0	0	26	22.5	25.04	19.60	0.96	2.90
17	0	1	-1	15.5	9	11.81	10.12	3.69	-1.12
Level	A (g L ⁻¹) CSL		B (g L ⁻¹) Sucrose		C (g L ⁻¹) KH ₂ PO ₄				
-1	30		5		0.1				
0	50		10		0.5				
1	70		15		0.9				

Response optimization and experimental validation: The optimal concentrations of the three significant factors were estimated using an optimizer tool of the software. Validation of the model was then carried out by performing the experiments at the optimal conditions and the experimental antimicrobial activity was compared to that of the predicted model.

Results and Discussion

Screening of antimicrobial properties of the strain *S. tamanrassetensis* DSM 45947: Preliminary analysis of the strain antimicrobial activity showed a broad-spectrum of antagonism against most of the tested microorganisms. The results (Fig. 1) showed that this strain exhibited a strong antibacterial activity against certain gram-positive bacteria. The highest activities were observed against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c (29 mm) and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (21 mm). However, weak (< 10 mm) or no antimicrobial activities were observed against gram-negative bacteria and yeast strains.

Strain *S. tamanrassetensis* showed positive activity against sixteen of the twenty filamentous fungi tested. The highest inhibition distance (23 mm) was observed against *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 and moderate inhibition distances (10-15 mm) were observed against *Aspergillus westerdijkiae* and *Fusarium moniliforme*. Moderate activity (15 mm) was also observed against the mycoplasma *Ureaplasma parvum* ATCC 27813. The antibacterial activity recorded against the methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is very interesting. Antibiotic resistance has been described in numerous pathogens in varying contexts including MRSA^{12,21}. This organism was reported to be the second most frequent etiologic agent in bloodstream infections, lower respiratory tract and skin infections^{15,27}. The increasing antimicrobial resistance has created a clear need to develop new antibiotics with novel mechanisms of action. The phytopathogenic fungi tested, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* is the agent of vascular wilt (fusariosis) of date palm^{9,13}. This fungus causes significant deteriorations to different parts of the affected plants. In addition, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* is one of the most destructive diseases of tomatoes.

Furthermore, activities obtained against *Aspergillus carbonarius* and *A. westerdijkiae* are very interesting. These two fungi produce ochratoxin A which is a dangerous toxin for humans and animals. These results encourage further research on the antimicrobial activity of strain *S. tamanrassetensis* DSM 45947. The most sensitive strains methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c (MRSA) and the fungus *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (UR), were selected as indicators for the determination of antimicrobial activities in the optimization experiments.

Screening of factors affecting the antimicrobial activity using Plackett-Burman design: Seven physio-chemical parameters of culture medium were investigated for maximum antimicrobial activity against MRSA and UR.

The responses from the 12 trials (Table 2) showed a wide variation of the antimicrobial activity ranging from 0 to 20 mm. This variation reflected the importance of medium optimization to reach a higher antibiotic activity. Effects and variable analysis for antibiotic assay results using PBD are presented in supplementary table S1.

Out of the 7 factors, sucrose, CSL and KH₂PO₄ had the highest t-values. Furthermore, based on the confidence level, a normal plot chart representation of the standardized effects showed the dominance of these three individual variables

(Supplementary Fig. S1). In the case of an activity against the fungus UR, CSL, sucrose and KH₂PO₄ increased antibiotic production, while the factor CaCl₂ decreased antifungal production (Supplementary Fig. S1a).

The smaller probability value $p < 0.05^{10}$ confirmed that sucrose, CSL and KH₂PO₄ had significant influences on the activity. The same was supported by the Pareto chart (Supplementary Fig. S2) in which important effects were assigned to the factors whose histogram is in the upper.

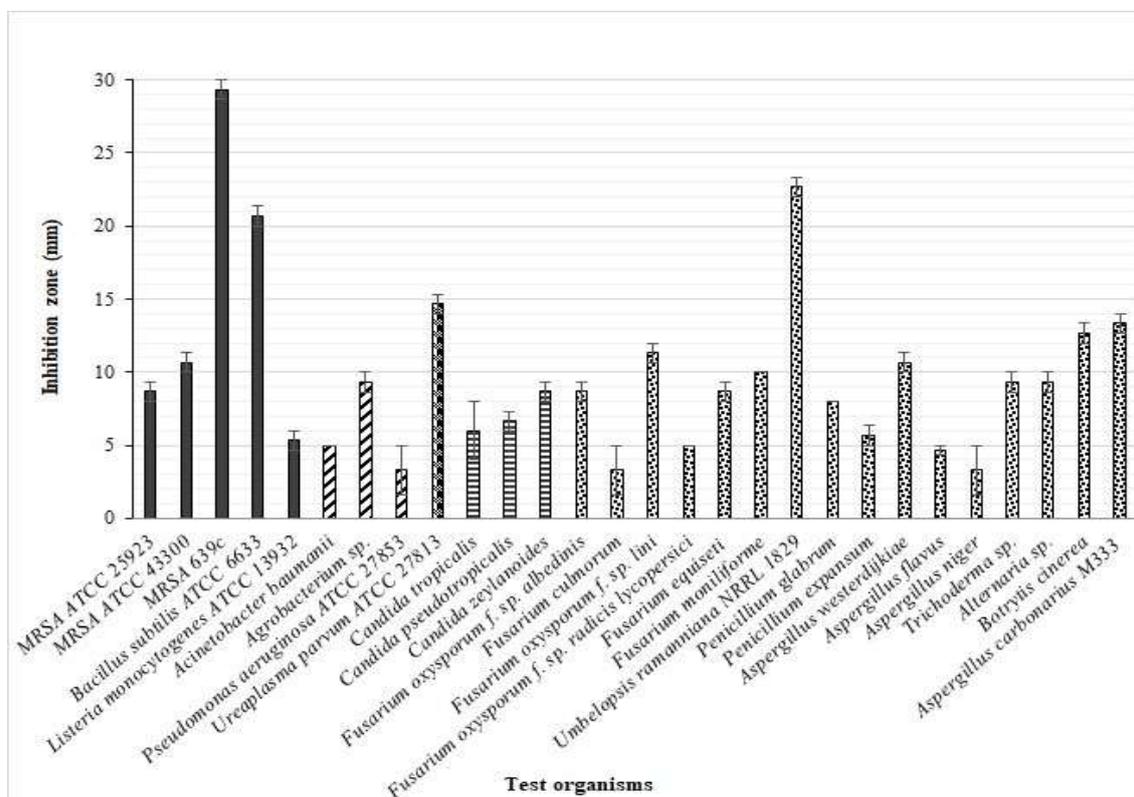


Figure 1: Antimicrobial activity of *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 against various test microorganisms
No activity obtained against the Gram-negative bacteria: *Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91 and *Escherichia coli* E52, the yeasts *Candida albicans* IPA200, *C. albicans* IPA988, *C. glabrata* and *C. guilliermondii* and the filamentous fungi *Fusarium solani*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum* and *Aspergillus parasiticus* CBS 100926. The results represent the mean ± standard error of three experiments against each strain tested

Table S1
Plackett-Burman design and regression analysis on antimicrobial production by *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947

Factors	Codes	Effect		Coefficient		t-value		p-value	
				MRSA ^a	UR ^b	MRSA	UR	MRSA	UR
Constant				13.778	10.833	31.03	17.36	0.000	0.000
Sucrose	X ₁	2.222	2.778	1.111	1.389	2.50	2.23	0.018*	0.034*
K ₂ HPO ₄	X ₂	1.778	0.111	0.889	0.056	2.00	0.09	0.055	0.930
CaCl ₂	X ₃	1.556	-2.778	0.778	-1.389	1.75	-2.23	0.091	0.034
NaCl	X ₄	0.889	0.111	0.444	0.056	1.00	0.09	0.325	0.930
CSL ^c	X ₅	5.333	11.667	2.667	5.833	6.01	9.35	0.000*	0.000*
Inc time ^d	X ₆	1.556	1.667	0.778	0.833	1.75	1.34	0.091	0.192
KH ₂ PO ₄	X ₇	6.000	4.778	3.000	2.389	6.76	3.83	0.000*	0.001*

^a Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c, ^b *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829, ^c Corn steep liquor, ^d Incubation time, * Significant at 5% level.

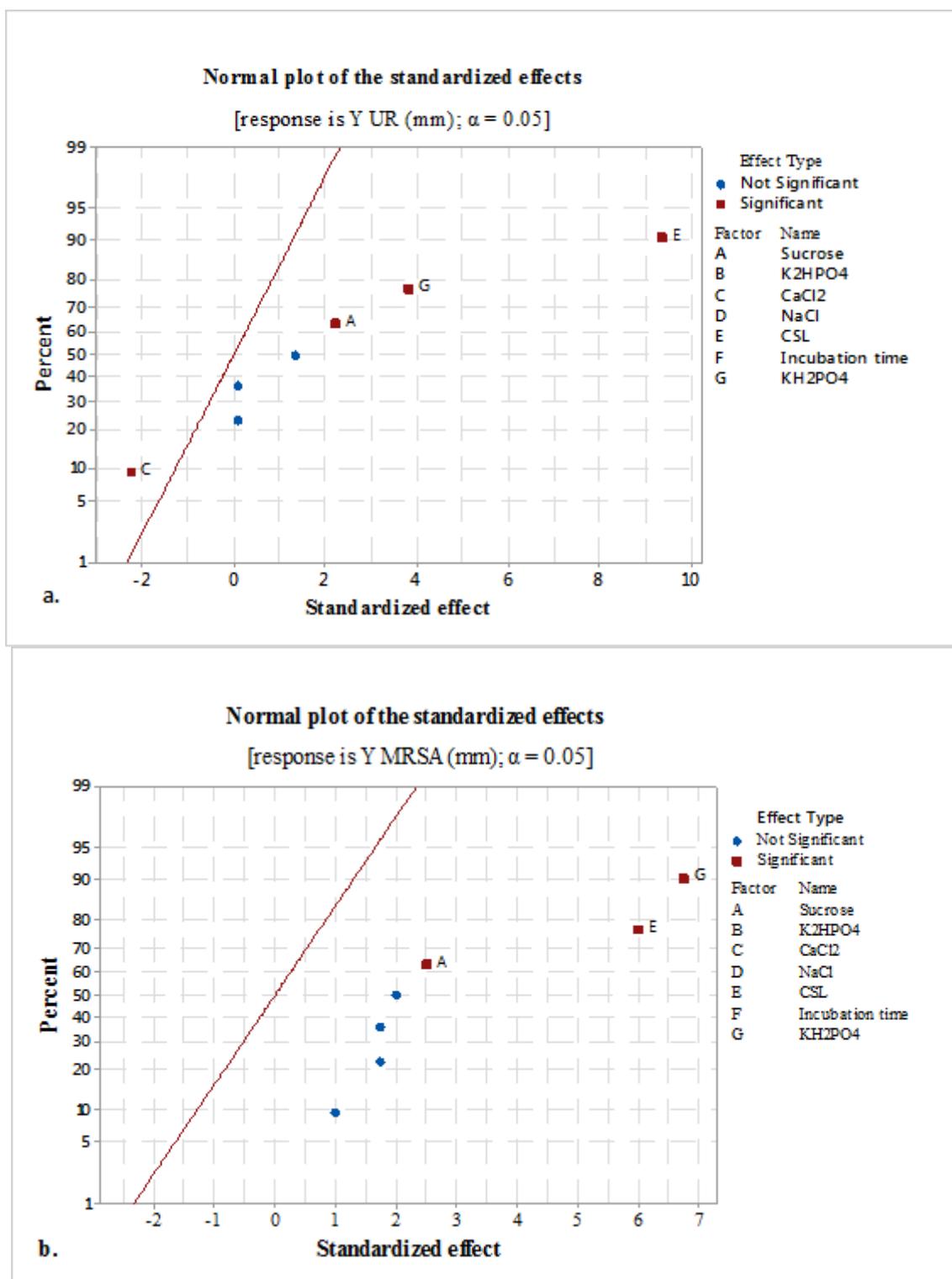


Fig. S1: Normal plot chart of standardised effects of process variables for antimicrobial production against (a) *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 and (b) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c

PB experiment revealed that KH₂PO₄ was the most influential factor for antimicrobial production by *S. tamanrassetensis* DSM 45947, which is in line with the study of Wang et al⁴⁰ for a *Saccharothrix* strain and with that of Al-Sarrani and El-Naggar¹ for the production of citrinin, an antibiotic synthesized by the fungus *Monascus ruber*. Many studies identified sucrose, among various carbon sources, as the essential nutrient for antibiotic production^{7,16}.

In fact, researchers support the development of a cost-effective fermentation medium and CSL was proved among various nitrogen sources, to yield maximal metabolite production as reported by Sharma et al³¹, Sircar et al³⁴, Tan et al³⁸ and Zhang and Jia⁴³. The key variables CSL, sucrose and KH₂PO₄, were selected for further optimization using RSM.

Box Behnken design for optimization of medium constituents: The BBD under the RSM was applied to study the effect of the three variables, CSL, sucrose and KH_2PO_4 on antimicrobial activity. According to multiple regression analysis of the experimental data, two regression equations

were found to give an adequate description of the antibiotic activity and calculate the optimum levels of each variable.

$$Y_{(\text{MRSA})} = -87.9 + 54.8C + 4.19B + 3.147A - 27.34C^2 - 0.0750B^2 - 0.02719A^2 - 0.875CB - 0.031CA - 0.0525BA \quad (4)$$

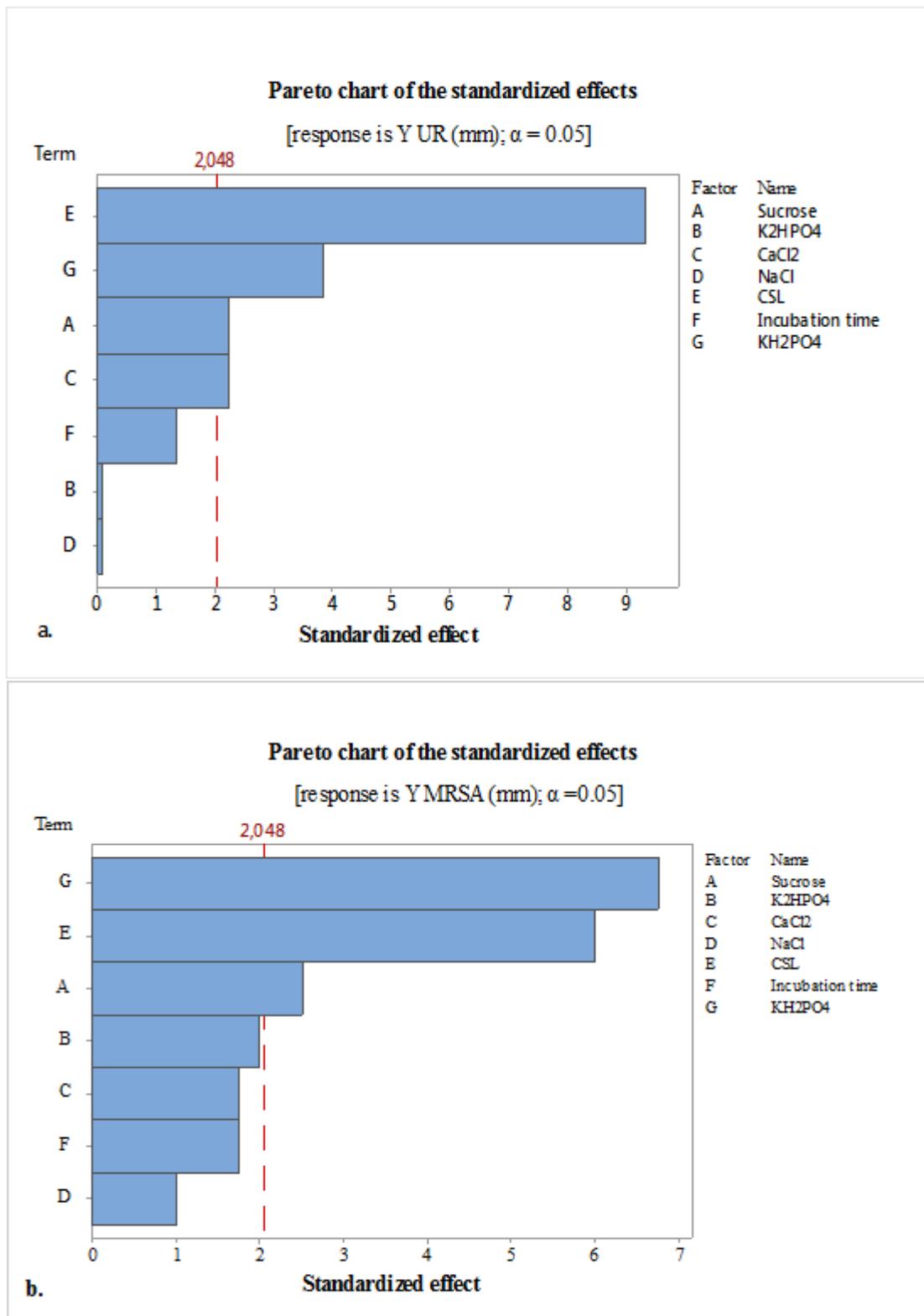


Fig. S2: Pareto chart showing the effect of seven factors on antimicrobial activity against (a) *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 and (b) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c

$$Y_{(UR)} = -90.96 + 48.05C + 4.596B + 2.756A - 10.08C^2 - 0.1245B^2 - 0.02059A^2 - 0.687CB - 0.3437CA - 0.03750BA \quad (5)$$

where $Y_{(MRSA)}$ and $Y_{(UR)}$ express the predicted antimicrobial activity (i.e. inhibition zone) obtained against the corresponding germ test. A, B and C are CSL, sucrose and KH_2PO_4 respectively. According to the design matrix, 17 experiments were performed and the predicted and observed responses were reported in table 3. The highest experimental value for an inhibition zone was 26 mm, while the predicted response based on RSM was estimated to be 25 mm in run n° 16 (Table 3). The results were analyzed by standard analysis of variance (ANOVA) which are given in Supplementary table S2.

ANOVA demonstrated that the three models were highly significant, as it was evident from the very low probability p-value (< 0.0001) of the Fisher's F-test (F model = 29.21 and 39.05 for MRSA and UR respectively). The two models were also statistically insignificant "Lack of fit F-value" of 69.5 and 12.375 corresponding to MRSA and UR respectively which suggested that the obtained experimental data were in good fit.

The regression coefficients t and p-values of the variables CSL (A), sucrose (B) and KH_2PO_4 (C) on antimicrobial activity against MRSA and UR are given in table 4 at 95 and 99% significance level. The results showed that the linear coefficients of CSL (A), KH_2PO_4 (C), their quadratic coefficients (A^2) and (C^2) and the interaction between CSL and sucrose (AB), are the most significant factors affecting activity against the two tested microorganisms followed by sucrose (B^2) and (AC) then (B). The values in table 4 implied that the concentrations of CSL and KH_2PO_4 had a strong influence on the antimicrobial activity against the tested microbes. The mutual interaction between CSL and sucrose (AB) was considered as highly important in the two models (p-value < 0.0001) as opposed to (BC) interactions.

The interactive effect of CSL and KH_2PO_4 (AC) for UR was significant (p < 0.001), but insignificant for MRSA. The

linear factor of KH_2PO_4 (C) with positive coefficients (6.875 and 5.563 for MRSA and UR respectively) indicated highly significant effects to increase antimicrobial activity against the tested germs. The factor CSL (A) had only one positive coefficient (3.000) against UR, which indicated a positive effect on the antifungal activity. The rest of factors reflected a decrease on antimicrobial activity.

These results combined with those obtained in ANOVA (Supplementary Table S2) suggested that there is a direct relationship between concentrations of the three variables in the medium and the increase or decrease of the antimicrobial activity. Moreover, antibacterial activity and/or antifungal activity was dependent on these concentrations. Increased KH_2PO_4 concentration favoured antimicrobial activity, but increased CSL concentration enhanced activity only against UR. The rest of the factors and interactions with negative coefficients indicated the presence of a maximum activity point.

By determining the coefficient R^2 , the goodness of fit of the model was investigated. In this study, the value of the R^2 0.9163 for MRSA and 0.9361 for UR showed good fitness of the two models. High level of adjusted coefficient 0.8850 for MRSA and 0.9121 for UR also indicated a good fit between the observed and predicted responses (Table 4). These measures indicated that the response equations (4) and (5) provided suitable models for process optimization of antimicrobial activity of *S. tamaris* DSM 45947.

Two dimensional plots: To illustrate the interaction between the parameters and the optimum level of tested components on antimicrobial activity, 2D contour response surface graphs were plotted and shown in fig. 2. From these 2D response surface plots, the optimal values of the independent variables and the maximum response could be predicted. Each 2D plot presented the interactive effects of two variables while the third parameter was fixed at the central point. Significance of the interactions between the corresponding variables is indicated by an elliptical contour plot²⁶ and the maximum predicted response is indicated in the smallest ellipse in the contour diagram⁴².

Table S2
ANOVA analysis of the experiential model for the antibiotic activity against the two tested microorganisms

Source	DF	Sequential sum of squares		Adjusted sum of squares		Adjusted mean of square		F-value		p-value		Significance
		MRSA ^a	UR ^b	MRSA	UR	MRSA	UR	MRSA	UR	MRSA	UR	
Model	9	2404.38	1552.48	2404.38	1552.48	267.15	172.50	29.21	39.05	<0.0001	<0.0001	Significant
Linear	3	893.50	644.13	893.50	644.12	297.83	214.71	32.56	48.60	<0.0001	<0.0001	
Square	3	1265.38	720.22	1265.38	720.23	421.79	240.07	46.12	54.34	<0.0001	<0.0001	
Way interaction	3	245.50	188.13	245.50	188.13	81.83	62.71	8.95	14.19	0.000	0.000	
Error	24	219.50	106.03	219.50	106.03	9.146	4.42	132.68	3.77	0.000	0.026	
Lack of fit	3	208.50	37.13	208.50	37.13	69.500	12.37					Not significant
Pure error	21	11.00	68.90	11.00	68.90	0.524	3.28					
Total	33	2623.88	1658.50									

^aMethicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c, ^b *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829

Table 4
Regression coefficient and their significance of the quadratic model

Term	Coefficient		SE Coef		t-value		p-value	
	MRSA	UR	MRSA	UR	MRSA	UR	MRSA	UR
Constant	25.000	19.600	0.956	0.665	26.14	29.49	0.000**	0.000**
A-CSL (L)	-2.250	3.000	0.756	0.625	-2.98	5.71	0.0007**	0.000**
B-Sucrose (L)	-1.875	-0.562	0.756	0.625	-2.48	-1.07	0.021*	0.295
C-KH ₂ PO ₄ (L)	6.875	5.563	0.756	0.625	9.09	10.59	0.000**	0.000**
AB (I)	-5.25	-3.750	1.07	0.743	-4.91	-5.05	0.000**	0.000**
AC (I)	-0.25	-2.750	1.07	0.743	-0.23	-3.70	0.817	0.001**
BC (I)	-1.75	-1.375	1.07	0.743	-1.64	-1.85	0.115	0.077
A ² (Q)	-10.87	-8.237	1.04	0.724	-10.44	-11.37	0.000**	0.000**
B ² (Q)	-1.87	-3.112	1.04	0.724	-1.80	-4.30	0.085	0.000**
C ² (Q)	-4.38	-1.613	1.04	0.724	-4.20	-2.23	0.000**	0.036*

MRSA: S = 2,37259 R-sq = 0.9163 R-sq(adj) = 0.8850; UR: S = 2,10183 R-sq = 0.9361 R-sq(adj) = 0.9121.
(L): Linear term; (I): Interaction term; (Q): Quadratic term. *Significant at 5%-level, **: Significant at 1%-level.

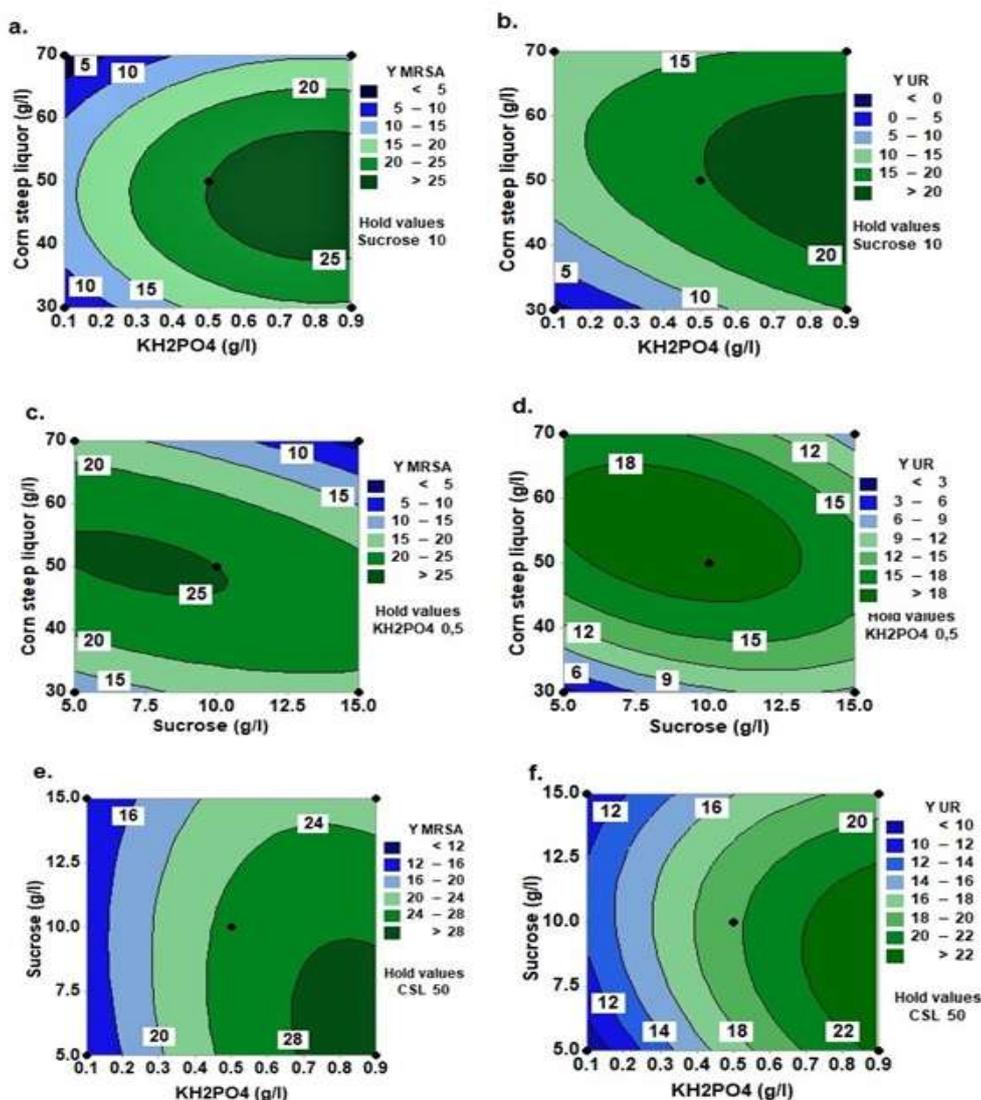


Figure 2: Two-dimensional contour plot showing interactions among variables CSL, sucrose and KH₂PO₄ concentrations for maximum antimicrobial activity produced by *S. tamarrassetensis* DSM 45947 (a, b) represent the effect of CSL and KH₂PO₄; (c, d) represent the effect of CSL and sucrose and (e, f) represent the effect of sucrose and KH₂PO₄ on the antibiotic activity production against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c (MRSA) and *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (UR)

Fig. 2a shows that CSL had no significant interaction with KH_2PO_4 for antibacterial activity. This is evident from the relatively circular nature of the contour curves (Fig. 2a). However, for the antifungal activity against *U. ramanniana* (Fig. 2b), there is a significant interaction between KH_2PO_4 and CSL. Above the moderate concentration of KH_2PO_4 , the antifungal activity increased with CSL concentration increase from 31 to 52 g L^{-1} and any further decrease in its values decreased this activity. The optimal concentrations of KH_2PO_4 and CSL were around 0.9 g L^{-1} and 50 g L^{-1} . The contour plots in fig. 2c and d were of elliptical nature indicating that there was a mutual interaction between sucrose and CSL.

It means that antibiotic production was dependent on the CSL and sucrose concentrations. The maximum inhibition at optimum CSL indicates the sensitiveness of the process to CSL level. Under the middle level of sucrose and at optimum CSL concentration, antibiotic activity increased as expressed by the dark green area (Fig. 2c and d).

However, further increase in these concentrations decreased this activity. In case of the interaction between sucrose and KH_2PO_4 (Fig. 2e and f), lower and higher levels respectively of both increased antibiotic activities. In this case, the activities were greater than 28 mm and 22 mm against MRSA and UR respectively.

Increases in sucrose concentration above the optimal level would reverse the trend. This analysis revealed that the optimal concentration of sucrose was around 6 g L^{-1} . Hence, the optimal levels of fermentation conditions were calculated by solving the quadratic models (4) and (5) as follows: $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.9 \text{ g L}^{-1}$, sucrose = 7 g L^{-1} and CSL = 52 g L^{-1} (Fig. 3).

Validation of the model: The optimized concentrations of nutrient factors predicted from RSM were experimentally validated. These experiments were carried out in triplicate in Erlenmeyer flasks. The results (Table 5) represent the average of the obtained antibiotic activities. The maximal antimicrobial activities obtained experimentally were found to be $33 \pm 1.00 \text{ mm}$ and $30 \pm 2.00 \text{ mm}$ against MRSA and UR. These were in close agreement with the predicted values. After optimization, the antibiotic activity was improved by 32% against MRSA and 36% against UR compared with the unoptimized conditions (Table 5).

These findings strongly support the use of response surface methodology for improving the antimicrobial activity of *S. tamanrassetensis* DSM 45947. Composition of the final optimized culture medium for maximum antimicrobial activity of *S. tamanrassetensis* DSM 45947 was established as follows: 52 g of corn steep liquor, 7 g of sucrose, 0.9 g of KH_2PO_4 , 2 g of NaCl, 1 g of CaCl_2 , 1 g of K_2HPO_4 , 0.2 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 L of distilled water, pH 7.2.

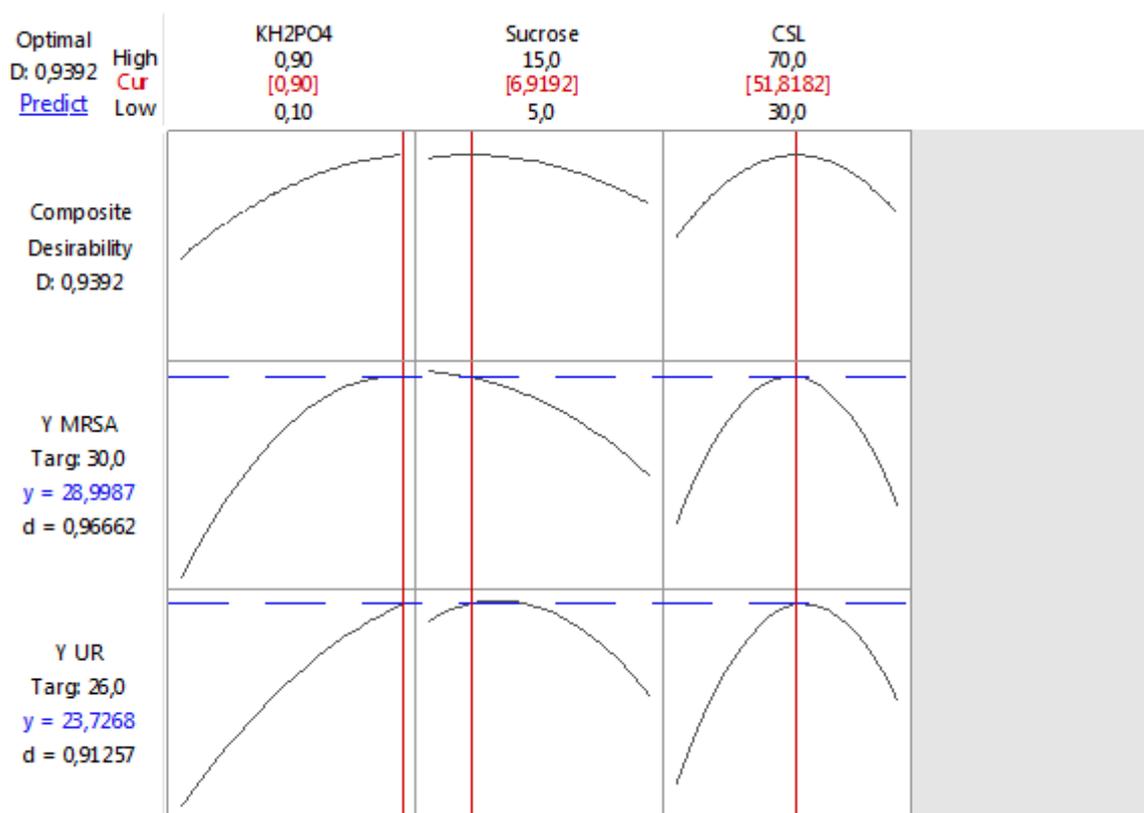


Figure 3: Optimal concentrations advocated parameters to achieve maximum antimicrobial activity by *S. tamanrassetensis* DSM 45947; MRSA: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c; UR: *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829

Table 5

Experimental validation of the combined effect of variables under optimized and unoptimized conditions on the antimicrobial activity of *S. tamanrassetensis* DSM 45947

Variables	Level (g L ⁻¹)		Germs	Antimicrobial activity (Inhibition zone in mm ± sd ^a)		
	Unoptimized	Optimized		Unoptimized	Optimized (Predicted)	Optimized (Experimental)
CSL	50	52	MRSA	25 ± 1.00	29 ± 1	33 ± 1.00
Sucrose	10	7				
KH ₂ PO ₄	0.5	0.9	UR	22 ± 1.80	24 ± 1	30 ± 2.00

^a Standard deviation

The genus *Saccharothrix* belongs to the rare actinobacteria and is known for being a promising source of new antimicrobial compounds. Many bioactive secondary metabolites have been reported from cultures of *Saccharothrix*. These include aminoglycoside, benzoquinone³⁶, tetrazomine³⁹, glycopeptide³⁷, carboxylic nucleoside⁶, dithiopyrrolones¹⁸, mutactimycins⁴⁴ macrolide²⁵, angucycline¹⁴, tianchimycins⁴¹ and antibiotics A4 and A5². However, few works were carried out to improve the antimicrobial activity of *Saccharothrix* strains. Bouras et al⁵ and more recently Merrouche et al²⁴ used classical methods to produce secondary metabolites by *Saccharothrix algeriensis*.

Our approach proposed an alternative to the use of an empiric medium (ISP2) by *S. tamanrassetensis* DSM 45947. Besides that, Wang et al⁴⁰ reported on the *Saccharothrix* genus. These authors optimized a culture medium based on agricultural waste products to improve the antimicrobial activity of *Saccharothrix yanglingensis* strain Hhs.015^T with low production costs. Our statistical procedure provides fundamental and useful data for improvement of antimicrobial activity production of strain DSM 45947.

Conclusion

The new species *Saccharothrix tamanrassetensis* DSM 45947 showed a broad-spectrum for antibacterial and antifungal activities, of which a strong activity was shown against a clinical pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and also the toxigenic and phytopathogenic fungi. The statistical tools PBD, BBD and RSM, were found to be very effective in optimizing the fermentation conditions and improving the antimicrobial activity. Out of seven factors selected, corn steep liquor, sucrose and KH₂PO₄ were found to have positive influence on antibiotic activity.

In the optimized medium, the antimicrobial activity of DSM 45947 was enhanced by 32% against MRSA and 36% against UR than the unoptimized medium. Validation experiments were carried out to verify the adequacy and the accuracy of the model and the results showed that the experimental values were in good agreement with the predicted ones. The optimum culture medium obtained will be useful for efficient antimicrobial production by this

original actinobacterium, both in large-scale fermentations and for the development of more advanced studies on the purification of active molecules and characterization of their biological activities.

Acknowledgement

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research in the frame of the 'Programme National Exceptionnel' of French-Algerian cooperation.

References

- Al-Sarrani A.M. and El-Naggar M., Application of Plackett-Burman factorial design to improve citrinin production in *Monascus ruber* batch cultures, *Bot Stu*, **47**, 167-174 (2006)
- Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A. and Mathieu F., Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil, *Microbiol Res*, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.11.005>, **168**, 223-230 (2013)
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P. and Sabaou N., *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil, *Int J Syst Evol Microbiol*, <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000104>, **65**, 1316-1320 (2015)
- Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A., Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3, *J Antibiot (Tokyo)*, **63**, 709-711 (2010)
- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A., Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, *Process Biochem*, **42**, 925-933 (2007)
- Bush B.D., Fitchett G.V., Gates D.A. and Langley D., Carbocyclic nucleosides from a species of *Saccharothrix*, *Phytochemistry*, **32**, 737-739 (1993)
- Dasu V.V. and Panda T., Optimization of microbiological parameters for enhanced griseofulvin production using response surface methodology, *Bioprocess Eng*, **22**, 45-49 (2000)
- Djinni I., Defant A., Kecha M. and Mancini I., Actinobacteria derived from algerian ecosystems as a prominent source of antimicrobial molecules, *Antibiotics*, **8**, 172 (2019)

9. El Modafar C., Mechanisms of date palm resistance to bayoud disease: current state of knowledge and research prospects, *Physiol Mol Plant Pathol*, **74**, 287-294 (2010)
10. Elibol M., Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology, *Process Biochem*, **39**, 1057-1062 (2004)
11. Genilloud O., Actinomycetes: still a source of novel antibiotics, *Nat Prod Rep*, <https://doi.org/10.1039/C7NP00026J>, **34**, 203-1232 (2017)
12. Gordon R.J. and Lowy F.D., Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Clin Infect Dis*, <https://doi.org/10.1086/533591>, **46(S5)**, S350–S359 (2008)
13. Ibrahim E.B., Mohamed M. and Rafik B., Bayoud disease of date palm in Algeria: History, epidemiology and integrated disease management, *African Journal of Biotechnology*, <https://doi.org/10.5897/ajbx2014.14292>, **14(7)**, 542–550 (2015)
14. Kalinovskaya N.I., Kalinovskiy A.I., Romanenko L.A., Dmitrenok P.S. and Kuznetsova T.A., New angucyclines and antimicrobial diketopiperazines from the marine mollusc derived actinomycete *Saccharothrix espanaensis* An 113, *Nat Prod Commun*, **5**, 597–602 (2010)
15. King M.D., Humphrey B.J., Wang Y.F., Kourbatova E.V., Ray S.M. and Blumberg H.M., Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections, *Ann Inter Med*, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-5-200603070-00005>, **144**, 309-317 (2006)
16. Kiruthika P., Nisshanthini S.D., Saraswathi A. and Rajendiran R., Application of statistical design to the optimization of culture medium for biomass production by *Exiguobacterium* sp. HM 119395, *Int J Adv Biotechnol Res*, [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)87001-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)87001-4), **2**, 422-430 (2011)
17. Kurtböke D.I., Biodiscovery from rare actinomycetes: an ecotaxonomical perspective, *Appl Microbiol Biotechnol*, <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3898-2>, **93**, 1843-1852 (2012)
18. Lamari L. et al, New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. physicochemical properties and structure elucidation, *J Antibio (Tokyo)*, **55**, 702-706 (2002)
19. Latha S., Sivaranjani G. and Dhanasekaran D., Response surface methodology: A non-conventional statistical tool to maximize the throughput of *Streptomyces* species biomass and their bioactive metabolites, *Critical Reviews in Microbiology*, <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1271308>, **43(5)**, 567-582 (2017)
20. Lewis K., New approaches to antimicrobial discovery, A review, *Biochem Pharmacol*, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.002>, **134**, 87-98 (2017)
21. Liu C. et al, Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children, *Clin Infect Dis*, **52(3)**, e18–e55 (2011)
22. Mandenius C.F. and Brundin A., Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology, *Biotechnol Prog*, <https://doi.org/10.1002/btpr.67>, **24**, 1191-1203 (2008)
23. Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F. and Lebrihi A., Isolation, taxonomy and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria, *Appl Environ Microbiol*, **77**, 6710-6714 (2011)
24. Merrouche R., Yekkour A., Coppel Y., Bouras N., Zitouni A., Lebrihi A., Mathieu F. and Sabaou N., A new dithiolopyrrolone antibiotic triggered by a long fermentation of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 in sorbic acid-amended medium, *Letters in Applied Microbiology*, **69**, <https://doi.org/10.1111/lam.13207> (2019)
25. Murakami R. et al, C and D, new cytotoxic 20-membered macrolides from *Saccharothrix* sp., AJ9571, *J Antibio*, **62**, 123–7 (2009)
26. Muralidhar R., Chirumamila R., Marchant R. and Nigam P., A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources, *Biochem Eng J*, **9**, 17-23 (2001)
27. Peebles E., Morris R. and Chafe R., Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric emergency department in Newfoundland and Labrador, *Can J Infect Dis Med Microbiol*, <https://doi.org/10.1155/2014/267901>, **25**, 13-16 (2014)
28. Plackett R.L. and Burman J.P., The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika*, <https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>, **33**, 305-325 (1946)
29. Savizi I.S.P., Soudi T. and Shojaosadati S.A., Systems biology approach in the formulation of chemically defined media for recombinant protein overproduction, *Appl Microbiol Biotechnol*, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10048-1>, **103(20)**, 8315-8326 (2019)
30. Sengupta S., Pramanik A., Ghosh A. and Bhattacharyya M., Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem, *BMC Microbiology*, **15(1)**, <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0495-4> (2015)
31. Sharma N., Prasad G.S. and Choudhury A.R., Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide, *Carbohydr Polym*, **93**, 95-101 (2013)
32. Shirling E.B. and Gottlieb D., Methods for characterization of *Streptomyces* species, *Int J Syst Bacteriol*, <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>, **16**, 313-340 (1966)
33. Singh V., Haque S., Niwas R., Srivastava A., Pasupuleti M. and Tripathi C.K.M., Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review, *Front Microbiol*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>, **7**, 1-16 (2017)
34. Sircar A., Sridhar P. and Das P.K., Optimization of solid-state medium for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, *Process Biochemistry*, **33(3)**, 283–289 (1998)

35. Strub C., Brandam C., Meyer X. and Lebrihi A., Investigations on *Saccharothrix algeriensis* growth on synthetic media, *J Biosci Bioeng*, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.010>, **106**, 148-153 (2008)
36. Takahashi A., Hotta K., Saito N., Morioka M., Okami Y. and Umezawa H., Production of novel antibiotic, dopsisamine by a new sub species of *Nocardiopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance, *J Antibiot*, **39**, 175–83 (1986)
37. Takeuchi M., Takahashi S., Enokita R., Sakaida Y., Haruyama H., Nakamura T., Katayama T. and Inukai M., Galacardins A and B, new glycopeptide antibiotics, *J Antibiot*, **45**, 297-305 (1992)
38. Tan J.P., Jahim J.M., Wu T.Y., Harun S. and Mumtaz T., Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*, IOP Conf Ser. Earth Environ. Sci, **36**, 012058 (2016)
39. Tsutomu Sato, Hirayama F., Saito T. and Kaniwa H., A new alkaloid antibiotic tetrazomine structure determination, *J Antibiot (Tokyo)*, **44(12)**, 1367-1370 (1991)
40. Wang X., Huang L., Kang Z., Buchenauer H. and Gao X., Optimization of the fermentation process of actinomycete strain Hhs.015 T, *J Biomed Biotechnol*, <https://doi.org/10.1155/2010/141876> (2010)
41. Wang X., Tabudravu J., Jaspars M. and Deng H., Tianchimycins A-B, 16-membered macrolides from the rare actinomycete *Saccharothrix xinjiangensis*, *Tetrahedron*, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.05.094>, **69**, 6060-6064 (2013)
42. Wang Y., Fang X., An F., Wang G. and Zhang X., Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology, *Microb Cell Factories*, **10(1)**, 98 (2011)
43. Zhang J. and Jia B., Enhanced butanol production using *Clostridium beijerinckii* SE-2 from the waste of corn processing, *Biomass and Bioenerg*, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.05.012>, **115**, 260–266 (2018)
44. Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A., Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities, *J Antibio (Tokyo)*, **57**, 367-372 (2004).

(Received 03rd June 2020, accepted 01st August 2020)