



HAL
open science

Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine

Manar Ibrahim

► **To cite this version:**

Manar Ibrahim. Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Poitiers; Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc, 2020. Français. NNT : 2020POIT2256 . tel-03340984

HAL Id: tel-03340984

<https://theses.hal.science/tel-03340984>

Submitted on 10 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale :

Chimie Ecologie Géosciences Agrosociétés « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biochimie, Biologie moléculaire

Présentée par :

Manar IBRAHIMI

Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine

Directeurs de Thèse :

Laurent Lemée, Yedir Ouhdouch

Soutenue le 7 mars 2020

devant la Commission d'Examen

JURY

Président	Mohamed Hafidi , Professeur, Université Cadi Ayyad, Marrakech
Rapporteur	Marie-Joëlle Virolle , Directrice de recherche, Université Paris Sud
Rapporteur	Jean-Hugues Renault , Professeur, Université de Reims
Membre	Yedir Ouhdouch , Professeur, Université Cadi Ayyad, Marrakech
Membre	Laurent Lemée , Ingénieur de Recherche, Université de Poitiers
Membre	Benoit Teychené , Maître de Conférences, Université de Poitiers

RÉSUMÉ

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux moyens de lutte contre les bactéries multirésistantes. L'approche suivie est le criblage d'actinobactéries d'origine marine, prédatrices facultatives des bactéries multirésistantes.

Les actinobactéries prédatrices ont été isolées à partir des eaux marines de la côte atlantique marocaine. Parmi les 142 prédateurs potentiels, 4 actinobactéries se sont avérées capables de croître en présence de *Micrococcus luteus* comme seule source de nutriments. En co-culture sur milieu solide, les quatre isolats ont montré une aptitude à croître sur différents types de bactéries à Gram + et à Gram- y compris les bactéries multirésistantes. En monoculture, l'activité antibactérienne sur un milieu riche (Bennett) a été testée via la méthode des disques d'agar. Les isolats d'actinobactéries sélectionnés montrent des spectres d'activité variables. L'étude taxonomique des 4 isolats sélectionnés par l'approche polyphasique a permis de les identifier comme étant des espèces appartenant au genre *Streptomyces*. La souche *S. griseoflavus* EMM111 a été retenue pour évaluer sa capacité à détruire par prédation la souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline. Les acides gras membranaires libérés sous forme d'esters méthyliques par thermochimioolyse couplée à la GC-MS ont permis de caractériser le prédateur et la proie. La co-culture du prédateur et de la proie, suivie pendant 15 jours, induit une augmentation de la quantité totale d'acides gras méthylés biomarqueurs de *S. griseoflavus* EMM111 mettant ainsi en évidence la prédation. La dernière partie de ce travail a été consacrée à l'extraction des molécules impliquées dans la prédation par la souche *S. griseoflavus* EMM111. Après fractionnement, plusieurs molécules ont été identifiées parmi lesquelles le di(2-ethylhexyl) phthalate, un composé présentant une activité bactéricide.

Mots clés : Acides gras, actinobactéries, bactéries résistantes aux antibiotiques, chimiotaxonomie, pyrolyse.

ABSTRACT

This thesis work is part of the research of new ways to fight against multidrug-resistant bacteria. The approach followed is the screening of non-obligate marine predatory actinobacteria for multidrug-resistant bacteria.

In this study, the isolation of predatory actinobacteria was carried out from the marine waters of the Moroccan Atlantic coast. Amongst the 142 potential predatory bacteria isolated from marine water of the Moroccan Atlantic coast, four *Actinobacteria* showed the aptitude to grow on agar-agar with *Micrococcus luteus* as the sole source of nutrients. In co-culture on solid medium, the four selected isolates showed an ability to grow on different types of gram positive and gram negative bacteria and including multidrug-resistant bacteria. However, in monoculture, the antibacterial activities in a rich medium (Bennett) was tested using agar cylinders method. The selected actinobacterial isolates showed a variable activity spectrum. Using the polyphasic approach, the taxonomic position of the four selected facultative actinobacterial predators showed that they belong to the *Streptomyces* genus. *S. griseoflavus* EMM111 strain was retained to assess its ability to prey and reduce Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by predation. Thermochemolysis-GC-MS was used to characterize the prey and the predator through their membrane fatty acids released as methyl esters (FAMES). The co-culture of predator and prey monitored for 15 days induced an increase in the total amount of methylated fatty acids biomarker of *S. griseoflavus* EMM111 thus demonstrating the predation. The last part of this work was dedicated to the extraction of the molecules involved in predation by *S. griseoflavus* EMM111. After fractionation, using chromatographic methods, several molecules were identified, one of it was di(2-ethylhexyl) phthalate, that has bactericidal activity.

Keywords: Fatty acid, Actinobacteria, multidrug resistant bacteria, chemotaxonomy, pyrolysis.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire de recherche intitulé « Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens par les actinobactéries prédatrices d'origine marine » a été réalisé dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre l'Université Cadi Ayyad (Marrakech, Maroc) et l'Université de Poitiers, France. Le travail a été effectué au sein du Laboratoire de Biotechnologies Microbiennes, Agrosciences et Environnement (BioMAGe) de la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech et à l'Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers.

Nom et prénom de l'auteur : IBRAHIMI Manar

➤ **Encadrant :**

- Yedir OUHDOUCH, Professeur.
- Laboratoire de Biotechnologies Microbiennes, Agrosciences et Environnement (BioMAGe), Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

- Laurent LEMEE, Ingénieur de recherche, HDR.
- Institut de Chimie des Milieux et Matériaux (IC2MP - CNRS UMR 7285), Université de Poitiers, France.

➤ **Co-encadrant :**

- Souad Loqman, Professeur.
- Laboratoire de microbiologie et virologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

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

- Laboratoire de Biotechnologies Microbiennes, Agrosciences et Environnement (BioMAGe), Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech, Maroc.
- Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers (IC2MP - CNRS UMR 7285), Université de Poitiers, 4 rue Michel Brunet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France.
- Laboratoire de microbiologie et virologie, Faculté de Médecine et de

Pharmacie, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

➤ **Cadre de coopération-soutien financier :**

- Campus France PHC TOUBKAL 2017 (12345AB).

➤ **Période de réalisation de la thèse : de Mars 2017 à Décembre 2019**

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés font l'objet d'une thèse en cotutelle au sein du Laboratoire de Biotechnologies Microbiennes, Agrosciences et Environnement (BioMAgE), Faculté des Sciences Semlalia, UCAM, Marrakech sous la direction du Professeur Yedir OUHDOUCH, et le Laboratoire de Microbiologie et Virologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Cadi Ayyad, Marrakech sous la direction du Professeur Souad LOQMAN conjointement avec l'Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers (IC2MP - CNRS UMR 7285), Université de Poitiers sous la direction de Dr Laurent LEMEE.

Je tiens d'abord à remercier Messieurs le Président de l'Université Cadi Ayyad et le Doyen de la Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech et le Président de l'Université de Poitiers pour l'effort et le soutien qu'ils accordent à la recherche scientifique.

J'adresse ma gratitude et je remercie mon directeur de thèse le Professeur Yedir OUHDOUCH, pour m'avoir donné l'opportunité d'être un élément dans son équipe, pour son ouverture d'esprit et son dynamisme qu'il insuffle dans son équipe. Merci de m'avoir accordé votre confiance, de m'avoir soutenu, et de m'avoir permis de mener à terme ce travail. Soyez assuré Monsieur de ma reconnaissance sincère, de ma gratitude ainsi que de mon profond respect.

Je tiens à remercier grandement mon directeur de thèse, Docteur Laurent LEMEE. Je le remercie pour toute son aide, ça ne sera pas suffisant pour lui exprimer toute ma grande reconnaissance pour la confiance, la disponibilité, la générosité, l'appui scientifique et le grand soutien qu'il m'a accordé pour faire avancer ce travail. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Mes plus profonds et sincères remerciements vont à Professeur Madame Souad LOQMAN, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de diriger ce travail. Sa riche expérience, sa gentillesse et ses précieuses directives tout au long de la réalisation de ce travail m'ont beaucoup impressionné.

Il m'est aussi agréable de remercier Monsieur Mohamed HAFIDI le directeur du Laboratoire de Biotechnologies Microbiennes, Agrosciences et Environnement (BioMAgE),

qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail et pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de ma thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent aux membres du jury. Merci au Pr. Marie-Joëlle VIROLLE, au Pr. Jean-Hugues RENAULT et au Pr. Khalid OUFDOU d'avoir accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteurs. Merci au Pr. Benoit TEYCHENE d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Noureddine MEZRIOUI responsable de l'équipe de Biotechnologies Microbiennes, pour ses conseils et les efforts déployés quant à l'avancement de la recherche scientifique.

J'exprime ma gratitude à tous les membres du Laboratoire de Biotechnologies Microbiennes, Agrosciences et Environnement (BioMAGe); les Professeurs : HASSANI L., MEZRIOUI N., OUFDOU K., RAFOUK L., IMZILN B. et BARAKATE M. pour m'avoir ouvert les portes de la recherche et m'avoir permis de réaliser à leurs côtés et dans les meilleures conditions, mes travaux de thèse. Je remercie vivement les techniciens du Laboratoire de Biotechnologies Microbiennes, Agrosciences et Environnement (BioMAGe) ; Lalla Malika, Si Bahssaine et Si Rachid.

Je remercie vivement Monsieur Bruno VIOLEAU Maître de Conférences à l'Université de Poitiers département de chimie pour ses conseils, son aide et sa disponibilité.

Je remercie également Cassandra VITSE pour son aide et sa disponibilité pour la réalisation des analyses en LCMS.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à mes collègues : ELAMRANI ZERRIFI S., KORICHI W., ZEGZOUTI Y., LKAMMARTE F., TAZART Z., EDDOUGHRI F., EL MEHDI R., TEBA A L., AIT LAARADIA M., EL ALAOUI EL FELS A., OUFQUIR S., MINAOUI F., HAKKOUM Z., EL-BOUAIDI W., LAZRAK K., MUGANNI R., EL ALAOUI A., OUBAHA B., BECHTAOUI N., BENIDIR L., BENIDIR L., KATIF C., EL HIDAR N., TAHIRI A., RAKLAMI A., EL MOHALIL S., EL GARRAOUI O., OUTAMMASSINE A., DILAGUI I., JALLALI A., AKKI et AZLAY L. Avec vous, j'ai pu avoir des discussions scientifiques intéressantes, échanger des éclats de rire et partager des instants inoubliables.

Un grand merci à tous les membres de ma famille qui m'ont guidé et soutenu moralement tout au long de ma thèse, tout particulièrement à mes parents IBRAHIMII Mohamed et MALIH Khadija qui ont toujours cru en moi, vous étiez toujours présents pour

m'aider, m'encourager et me pousser vers l'avant. Merci pour votre patience. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Un spécial remerciement à mon petit frère Jad. Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers toi. Puisse l'amour et la fraternité nous unir à jamais.

Un grand hommage à mes grands-parents qui n'ont pas pu voir le fruit de ce travail.

Et finalement, je voudrais remercier mes aimables amis qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études.

Encore un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

PLAN DE THÈSE

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
AVANT-PROPOS	III
REMERCIEMENTS	V
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XVIII
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Chapitre I Etude bibliographique	
1. Problématique de la résistance bactérienne	4
1. 1. Histoire des antibiotiques	4
1. 2. Résistance bactérienne	5
1. 3. Origine de l'émergence des résistances acquises	5
1. 4. Evolution des bactéries multirésistantes aux antibiotiques	6
1. 5. Principales bactéries multirésistantes.....	6
1. 6. Mécanismes de résistance	7
1. 7. Méthodes alternatives à la résistance bactérienne.....	8
2. Interactions microbiennes.....	11
2. 1. Interactions négatives.....	12
3. Bactéries prédatrices.....	13
3. 1. Historique	13
3. 2. Ecologie des bactéries prédatrices.....	17
3. 3. Stratégies de prédatations utilisées par les bactéries prédatrices	17
3. 4. Antibiotiques produits par les bactéries prédatrices.....	19
4. Actinobactéries	26
4. 1. Généralités.....	26

4. 2.	Historique	27
4. 3.	Morphologie des actinobactéries.....	28
4. 4.	Taxonomies des actinobactéries.....	30
4. 5.	Ecologie des actinomycètes et leur distribution dans le milieu marin	36
4. 6.	Cycle de développement	38
4. 7.	Métabolisme des actinobactéries.....	39
4. 8.	Antibiotiques produits par les actinomycètes marins.....	40
4. 9.	Actinobactéries prédatrices	47

Chapitre II Isolement et screening des isolats d'actinobactéries prédateurs

1.	Introduction	50
2.	Matériel et Méthodes	51
2. 1.	Echantillonnage.....	51
2. 2.	Isolement et screening des actinobactéries prédatrices.....	52
2. 3.	Purification des souches	53
2. 4.	Conservation des souches.....	53
2. 5.	Spectre de l'activité de prédation des isolats sélectionnés vis-à-vis différentes proies.....	54
2. 6.	Activité antibactérienne des isolats sélectionnés par la méthode conventionnelle sur milieu Bennett.....	54
2. 7.	Analyses Statistiques.....	55
2. 8.	Diffusion des antibactériens impliqués dans la prédation.....	55
2. 9.	Confirmation de l'implication des antibactériens dans la prédation.....	56
3.	Résultats et discussions	58
3. 1.	Caractéristiques physicochimiques des échantillons.....	58
3. 2.	Isolement et screening des actinobactéries prédatrices.....	59
3. 3.	Spectre d'activité de prédation des isolats sélectionnés vis-à-vis différentes proies et activité antibactérienne sur milieu de production riche (Bennett)	62

3.4. Diffusion et confirmation de l'implication des antibactériens dans la prédation.....	66
4. Conclusion.....	68

Chapitre III Caractérisation taxonomique des isolats prédateurs sélectionnés

1. Introduction	70
2. Matériel et méthodes	71
2.1. Préparation des inocula d'actinobactéries.....	71
2.2. Micromorphologie.....	71
2.3. Etude des caractéristiques culturelles des isolats d'actinobactéries sur milieux ISP.....	72
2.4. Utilisation des glucides	73
2.5. Production de pigments mélanoides.....	73
2.6. Détermination du type de l'acide diamino-2-6-pimélique (DAP) de la paroi cellulaire.....	73
2.7. Utilisation des acides aminés	73
2.8. Hydrolyse du Tween 80	74
2.9. Dégradation de l'amidon.....	74
2.10. Dégradation de la caséine du lait.....	74
2.11. Dégradation de la chitine.....	74
2.12. Croissance à différentes températures.....	75
2.13. Croissance à différents pH	75
2.14. Croissance sur le milieu Bennett à différentes concentrations en NaCl .	75
2.15. Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries prédatrices.....	75
3. Résultats et discussions	77
3.1. Etude morphologique des isolats d'actinobactéries prédateurs sélectionnés	77
3.2. Caractéristiques culturelles des souches d'actinobactéries prédatrices....	80

3. 3.	Caractéristiques physiologiques et production de pigment mélanoïde des isolats d'actinobactéries sélectionnés.....	83
3. 4.	Détermination du type de l'acide diamino-2-6-pimélique (DAP) de la paroi cellulaire.....	85
3. 5.	Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries prédatrices.....	85
4.	Conclusion.....	87

Chapitre IV Thermochimiolyse, outil chimiotaxonomique pour le suivi de l'interaction prédateur-proie

1.	Introduction	88
2.	Matériel et Méthodes	89
2. 1.	Co-culture.....	89
2. 2.	Préparation de la co-culture.....	90
2. 3.	Thermochimiolyse analytique (TMAH-Py-GC-MS).....	90
2. 4.	Quantification.....	91
2. 5.	Analyse statistique.....	91
3.	Résultats et discussions	93
3. 1.	Chimiotaxonomie de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la Méricilline (SARM) et l'actinobactérie prédatrice <i>Streptomyces griseoflavus</i> EMM111	93
3. 2.	Suivi de la prédation.....	96
3. 3.	Quantification et analyse statistique.....	98
4.	Conclusion.....	104

Chapitre V Essais préliminaires d'extraction des molécules impliquées dans la prédation

1.	Introduction	106
2.	Mode opératoire.....	107
2. 1.	Préculture en batch.....	107
2. 2.	Préculture de la proie.....	107

2. 3.	Culture en fermenteur.....	107
2. 4.	Extraction	107
2. 5.	Révélation microbiologiques	108
2. 6.	Evaluation de l'activité antibactérienne des fractions par la technique de micro-dilution en milieu liquide sur microplaque à 96 puits	109
2. 7.	Fractionnement chromatographique.....	110
2. 8.	Analyse par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse	112
2. 9.	Résonance magnétique nucléaire (RMN)	113
3.	Résultats et discussions	113
3. 1.	Culture et extraction par les solvants organiques.....	113
3. 2.	Choix du système de solvant pour la chromatographie sur couche mince..	115
3. 3.	Purification des fractions bioactives	115
4.	Conclusion.....	128
	Conclusion générale et Perspectives	129
	Références bibliographiques	135
	Annexe 1 : Milieux de cultures.....	159
	Annexe 2 : Spectres RMN.....	163

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de la variance

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

CCM : Chromatographie sur couche mince

D.D.T. : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DAP : diamino-2-6-pimélique

DMSO : Dimethyl sulfoxide

GC-MS : Chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse

LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

g/l : gramme par litre

g : gramme

L : litre

mg/L : milligramme par litre

µg/mL : microgramme par millilitre

mL : millilitre

min : minute

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

h : heure

Hz : hertz

ISP : International *Streptomyces* Project

m/z : rapport masse/charge

MS : Spectroscopie de masse

OMS : Organisation mondiale de la santé

µm : micromètre

mm : millimètre

t/min: tour par minute

PCR : Polymérase Réaction en chaine

ppm : partie par million

RMN : Résonance magnétique nucléaire

Rpm : Rotations par minute

SDS : Sodium dodecyl sulfate

t/min : tour par minute

TBE : Tris Borate EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid)

TMAH : Hydroxyde de tétraméthyl ammonium

U.V. : Ultra violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Chronologie de la découverte des principales classes d'antibiotiques (Singh and Barrett, 2006)	4
Figure 2. Mode d'action des antibiotiques (Chaussade et <i>al.</i> , 2013)	8
Figure 3. Stratégies utilisées par les bactéries prédatrices.	19
Figure 4. Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Alonso, 2007).....	28
Figure 5. Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinobactéries. (A) Bactéries du genre <i>Nocardia</i> qui se fragmentent, (B) Bactéries du genre <i>Streptomyces</i> en sporulation. Barre d'échelle : 1 μ m (Belyagoubi, 2014).....	29
Figure 6. Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs) (Prescott et <i>al.</i> , 2003)	30
Figure 7. Arbre phylogénétique basé sur 97 séquences du génome des actinobactéries (Ait Barka et <i>al.</i> , 2016).....	31
Figure 8. Morphologie des spores des actinobactéries (Breton and Theilleux, 1989)	32
Figure 9. Différentes chaînes de spores chez les actinobactéries (Ait Barka et <i>al.</i> , 2016)	33
Figure 10. Cycle de développement des actinobactéries (Ait Barka et <i>al.</i> , 2016)	39
Figure 11. Lieux d'échantillonnage des souches d'actinobactéries	51
Figure 12. Etude du spectre de l'activité de prédation.....	54
Figure 13. Mise en évidence de l'activité antibactérienne en milieu solide par le test des cylindres d'agar	55
Figure 14. Technique d'étude de la diffusion de l'antibiotique impliqué dans le processus de prédation.....	56
Figure 15. Principe de la méthode d'adsorption des molécules actives	57
Figure 16. Vérification de la méthode d'adsorption des molécules actives par les disques de papiers	58
Figure 17. Etapes d'isolement des actinobactéries prédatrices. (a) Absence de croissance de <i>M. luteus</i> sur agar- agar (b) Absence de croissance sur agar-agar inoculé par l'échantillon (c) Croissance de <i>M. luteus</i> sur agar-agar (a) Inondé par le bouillon nutritif. (d) Croissance des potentiels prédateurs capables d'utiliser <i>M. luteus</i> comme proie.....	62
Figure 18. Action antibactérienne des 4 isolats d'actinobactéries vis-à-vis des 4 bactéries sur milieu Bennett. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type de trois répétitions	65

Figure 19. Mise en évidence de l'activité antibactérienne contre la souche <i>S. aureus</i> résistante à la Méricilline (SARM).....	65
Figure 20. Stratégie de prédation utilisée par l'isolat EMM111 contre <i>M. luteus</i> . (a) Reconnaissance de la proie. (b) et (c) Actinobactérie prédatrice chassant la proie en Wolfpack (d) Elimination totale de la proie après 15 jours (Grossissement × 400).....	66
Figure 21. Implication des substances diffusibles au cours de la prédation.....	67
Figure 22. Activité antibactérienne de l'isolat EMM111 contre la souche <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méricilline	67
Figure 23. Schéma présentant la culture sur lamelle (Ouchari, 2019)	71
Figure 24. Schéma présentant la culture sur lame (Anibou, 2008)	72
Figure 25. Aspect microscopique des colonies des isolats.....	77
Figure 26. Observation des spores, du mycélium aérien et du substrat de l'isolat EMM111 (a × 2000, b × 10000, c × 20000).....	78
Figure 27. Observation des spores, du mycélium aérien et du substrat de l'isolat EMM112 (a × 2000, b × 50000).....	79
Figure 28. Observation des spores, du mycélium aérien et du substrat de l'isolat EMM183 (a × 1000, b × 10,000).....	79
Figure 29. Observation des spores, du mycélium aérien et du substrat de l'isolat EMM194 (a × 5000, b × 10000, c × 26,000).....	80
Figure 30. Pyrogramme (TMAH, 600 °C) de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la Méricilline (SARM)	94
Figure 31. Pyrogramme (TMAH, 600 °C) de l'actinobactérie prédatrice <i>Streptomyces griseoflavus</i> EMM111	95
Figure 32. Abondance relative (%) des acides gras (méthylés) dans la souche <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la Méricilline (SARM).....	95
Figure 33. Abondance relative (%) des acides gras (méthylés) dans l'actinobactérie prédatrice <i>Streptomyces griseoflavus</i> EMM111	96
Figure 34. Abondance relative (%) des acides gras (méthylés) au cours de la co-culture (T0, T8 et T15).....	97
Figure 35. Scree plot des valeurs propres à partir de l'ACP	102
Figure 36. Diagramme de composante ACP des acides gras de SARM, EMM111 et au cours de la co-culture (T0, T8 et T15)	103
Figure 37. Diagramme de la classification ascendante hiérarchique des acides gras de SARM, EMM111 et au cours de la co-culture (T0, T8 et T15)	103

Figure 38. Extraction du surnageant de <i>S. griseoflavus</i> EMM111 par l'acétate d'éthyle.....	108
Figure 39. Schéma de la technique de micro-dilution.....	110
Figure 40. Chromatographie préparative sur couche mince (CCM).....	111
Figure 41. Différentes phases obtenues après extraction de la culture liquide de la souche EMM111 prédatrice par l'acétate d'éthyle. (a) Phase organique. (b) Phase aqueuse.....	114
Figure 42. Activité antibactérienne des différentes phases obtenues après extraction de la culture liquide de la souche <i>S. griseoflavus</i> EMM111 par l'acétate d'éthyle vis-à-vis SARM	114
Figure 43. Activité antibactérienne de l'extrait de la souche <i>S. griseoflavus</i> EMM111 par l'acétate d'éthyle vis-à-vis SARM par la technique des puits	115
Figure 44. Protocole de séparation des fractions bio actives	117
Figure 45. Spectre de masse de la fraction 4, impact électronique (70 eV).....	118
Figure 46. Bibliothèque NIST	118
Figure 47. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la Fraction 4	119
Figure 48. Spectre RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) de la Fraction 4.....	119
Figure 49. Activité antibactérienne de la fraction contenant le di(2-ethylhexyl) phthalate vis-à-vis SARM.....	120
Figure 50. Protocole de séparation de la fraction bioactive FC7b	123
Figure 51. Protocole de séparation de la fraction bioactive FC9b	124
Figure 52. Chromatogramme (SIM 303 et 305) obtenu par couplage LCMS de la fraction FC9b3	126
Figure 53. Spectres de masse obtenus par LCMS de la fraction FC9b3	126
Figure 54. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de la Fraction FC732	163
Figure 55. Spectre RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) de la Fraction FC732	163
Figure 56. Spectre COSY ¹ H- ¹ H de la Fraction FC732	164
Figure 57. Spectre HSQC ¹ H- ¹³ C de la Fraction FC732	164
Figure 58. Spectre DEPT 135 de la Fraction FC732.....	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Différentes classes d'antibiotiques utilisées contre les bactéries multirésistantes (Battraud, 2017)	10
Tableau 2. Interactions négatives au sein d'une communauté (Massias, 2008)	11
Tableau 3. Principales bactéries prédatrices et leurs caractéristiques.....	15
Tableau 4. Métabolites secondaires produits par les bactéries prédatrices et leur activité biologique.....	20
Tableau 5. Différents types de parois et leurs constituants majoritaires chez les actinobactéries (Loqman, 2009).....	35
Tableau 6. Répartition des actinobactéries dans la nature (Goodfellow and Williams, 1983)	37
Tableau 7. Liste des antibiotiques produits par les actinobactéries marines (Kokare, 2008) .	41
Tableau 8. Métabolites secondaires isolés à partir des actinobactéries en co-culture avec d'autre bactérie	48
Tableau 9. Paramètres physico-chimiques des échantillons analysés.....	59
Tableau 10. Origine des isolats d'actinobactéries sélectionnés	61
Tableau 11. L'activité de prédation et antibactérienne des isolats sélectionnés vis-à-vis des différentes bactéries.....	64
Tableau 12. Croissance de la proie en fonction de la distance du prédateur	68
Tableau 13. Caractéristiques culturelles et présence de pigment mélanoïde des isolats d'actinobactéries sélectionnés	82
Tableau 14. Caractéristiques physiologiques des isolats d'actinobactéries prédateurs	84
Tableau 15. Comparaison des gènes de séquence de l'ARNr 16S des isolats avec ceux de la banque de bases des données NCBI BLAST	87
Tableau 16. Rapports représentatifs : [ramifié en C ₁₄ + ramifié en C ₁₆] sur acides gras totaux ; [C ₁₈ + C ₂₀] sur les esters méthyliques totaux ; <i>iso</i> -C ₁₅ sur <i>antéiso</i> -C ₁₅	98
Tableau 17. Quantité des acides gras méthylés obtenus par thermochemolyse-GCMS de SARM, de <i>S. griseoflavus</i> EMM111 et au cours de la co-culture (T0, T8 et T15) en (mg/g) .	99
Tableau 19. Variance totale expliquée	102
Tableau 21. Résultats de l'activité antibactérienne des fractions purifiées vis-à-vis différentes bactéries.....	121
Tableau 22. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentration minimales bactéricides (CMB) de la fraction di(2-ethylhexyl) phthalate	122

Tableau 23. Caractéristique des fractions obtenues sur colonne de silice	122
Tableau 24. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations.....	124
Tableau 25. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentrations minimales bactéricides (CMB) de la fraction FC9b3	124
Tableau 26. Antibiotiques produits par <i>Streptomyces griseoflavus</i>	127

INTRODUCTION
GENERALE

L'antibiothérapie s'est développée au début du XX^{ème} siècle après la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming. Les antibiotiques ont permis de grandes avancées dans le traitement des infections bactériennes en diminuant de façon importante la mortalité liée aux maladies infectieuses autrefois incurables (Zaffiri et *al.*, 2012). Par la suite, la découverte de nouvelles molécules a permis de sauver des milliers de vies, en particulier pendant la Seconde Guerre Mondiale (Muller, 2017; Quinn, 2013). Cependant, la prescription inappropriée d'antibiotiques, leur utilisation inadéquate et la réglementation insuffisante quant à leur usage ont compromis leur efficacité vis-à-vis nombreuses bactéries (Okeke et *al.*, 1999; Ventola, 2015). De ce fait, les antibiotiques ont favorisé l'élimination des bactéries sensibles et la sélection des plus résistantes, induisant ainsi l'émergence de la résistance bactérienne.

Les bactéries sont dites multirésistantes lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutiques (résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques) (Muller, 2017). La multirésistance concerne les bactéries des infections communautaires (ex. : pneumocoques, bacilles de la tuberculose) et les bactéries des infections nosocomiales (IN). *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant, *Acinetobacter baumannii* multirésistant, entérocoques résistant aux glycopeptides, les entérobactéries sécrétrices de Béta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) et les entérobactéries productrices de carbapénèmases constituent les principales bactéries multirésistantes qui représentent une menace particulière dans les hôpitaux (Avorn et *al.*, 2001; Lorcy and Dubé, 2018).

La prolifération de bactéries résistantes aux antibiotiques est en rapide progression, avec en parallèle une diminution du taux de découverte des nouveaux antibiotiques (Coates et *al.*, 2011; Guiral et *al.*, 2019; Huber et *al.*, 2019; Park et *al.*, 2018; Said and Abdelmegeed, 2019). La population mondiale se trouve ainsi confrontée à un grave problème de santé publique et la recherche de nouveaux agents antibactériens est devenue indispensable.

Différentes solutions sont envisagées pour combattre les bactéries multirésistantes : l'utilisation de produits traditionnels comme les huiles essentielles pour leur activité antiseptique (Kaloustian et *al.*, 2008), la phagothérapie (LaVergne et *al.*, 2018; Tamariz et *al.*, 2014), l'utilisation de produits biologiques tels que les peptides antimicrobiens (Geitani et *al.*, 2019; Lam et *al.*, 2016) et les antibiotiques (Ouchari et *al.*, 2019; Takahashi and Nakashima, 2018). Cependant, ces approches alternatives anti-infectieuses ne parviennent pas à remplacer le traitement par antibiotiques (Mangin, 2016). La recherche de nouvelles molécules

antibactériennes avec des nouvelles cibles produites par les actinobactéries offre une piste très prometteuse.

Les actinobactéries ont un métabolisme secondaire bioactif très élevé, produisant ainsi une importante quantité d'antibiotiques d'origine naturelle (Hoshino et *al.*, 2015b). Ces molécules sont produites par les actinobactéries pour inhiber la croissance des autres microorganismes concurrents avec lesquels elles sont en compétition dans leur biotope (Ortiz-Ortiz et *al.*, 2013). Des recherches récentes ont prouvé que le génome du genre *Streptomyces* possède beaucoup de gènes biosynthétiques responsables de la production de métabolites secondaires non exprimés (Baltz, 2019; Ikeda et *al.*, 2014). En effet, dans les conditions de laboratoire standard, les actinobactéries n'expriment qu'une très petite partie de leurs gènes et les autres restent cryptiques (Rutledge and Challis, 2015). Par conséquent, les gènes cryptiques des actinobactéries doivent être considérés comme une source encore non exploitée de métabolites secondaires (Olano et *al.*, 2014).

L'utilisation de bactéries prédatrices est une des approches qui permet de stimuler la production de métabolites secondaires (Korp et *al.*, 2016; Shatzkes et *al.*, 2017). En effet, plusieurs études ont montré que certaines bactéries peuvent être des prédateurs obligatoires ou facultatives d'autres bactéries (Casida Jr, 1982; Singh, 1947). On peut citer à titre d'exemple, *Ensifer adhaerens* (Druga et *al.*, 2011), *Cupriavidus necator* (Kreutzer et *al.*, 2012; Makkar and Casida Jr, 1987), *Lysobacter sp.* (Seccareccia et *al.*, 2015; Li et *al.*, 2008), *Bdellovibrionales* (d-BALOs) (Pasternak et *al.*, 2014; Markelova, 2010; Abram et *al.*, 1974) et *Myxobacteria* (McBride and Zusman, 1996; Reichenbach and Höfle, 1993; Kunze et *al.*, 1989).

Les actinobactéries sont traditionnellement considérées comme des antagonistes plutôt que comme des prédateurs, ce qui explique pourquoi leur écologie et leur physiologie ont souvent été négligées. Un nombre limité de recherches ont porté sur la prédation des actinobactéries par les seuls genres *Streptomyces* et *Agromyces ramosus* qui ont exprimé cette capacité (Casida, 1983; Ibrahimi et *al.*, 2020, 2019; Kumbhar et *al.*, 2014; Waksman and Woodruff, 1941).

Il est ainsi fort probable que les gènes cryptiques responsables de la production de métabolites secondaires par les actinobactéries puissent être activés dans des conditions spécifiques telles que la prédation. Pour augmenter les chances de trouver de nouvelles espèces d'actinobactéries prédatrices, il faut les chercher dans un milieu oligotrophe non encore exploré où la prédation est bien exprimée, ce qui est le cas du milieu marin marocain. A notre

connaissance, aucune étude scientifique approfondie sur les actinobactéries marines prédatrices n'a été publiée à ce jour. Le milieu marin marocain est une source potentielle d'actinobactéries à explorer.

L'objectif principal de ce travail est d'isoler et d'identifier les substances actives contre les bactéries multirésistantes, produites par des actinobactéries prédatrices. Dans ce but, nous avons combiné l'isolement et le criblage pour la recherche d'actinobactéries prédatrices.

Ce manuscrit comporte 6 parties :

La partie bibliographique met en évidence la problématique de la résistance bactérienne au niveau mondial, les facteurs favorisant son développement, ainsi que les différentes méthodes alternatives utilisées pour son traitement. De plus, les différentes interactions microbiennes ont été passées en revue et développées en mettant l'accent sur les bactéries prédatrices. Finalement, elle est complétée par une étude taxonomique des actinobactéries, leur rôle écologique, leur distribution dans le milieu marin et l'état actuel des actinobactéries prédatrices connues.

Le premier chapitre est consacré à l'isolement et au screening des isolats d'actinobactéries prédatrices prélevés dans différents milieux marins marocains.

Le deuxième chapitre concerne la caractérisation taxonomique détaillée des quatre isolats sélectionnés.

Dans le troisième chapitre, la thermochimioanalyse couplée à la chromatographie et à la spectrométrie de masse est utilisée comme méthode chimio-taxonomique et pour le suivi de la prédation.

Le quatrième chapitre est consacré à l'extraction et à l'identification des molécules impliquées dans la prédation par la souche d'actinobactérie sélectionnée, présentant une activité prédatrice.

La dernière partie de ce manuscrit présente une synthèse et une conclusion générale, mettant en exergue l'importance des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse. Le manuscrit s'achève par la présentation des perspectives.

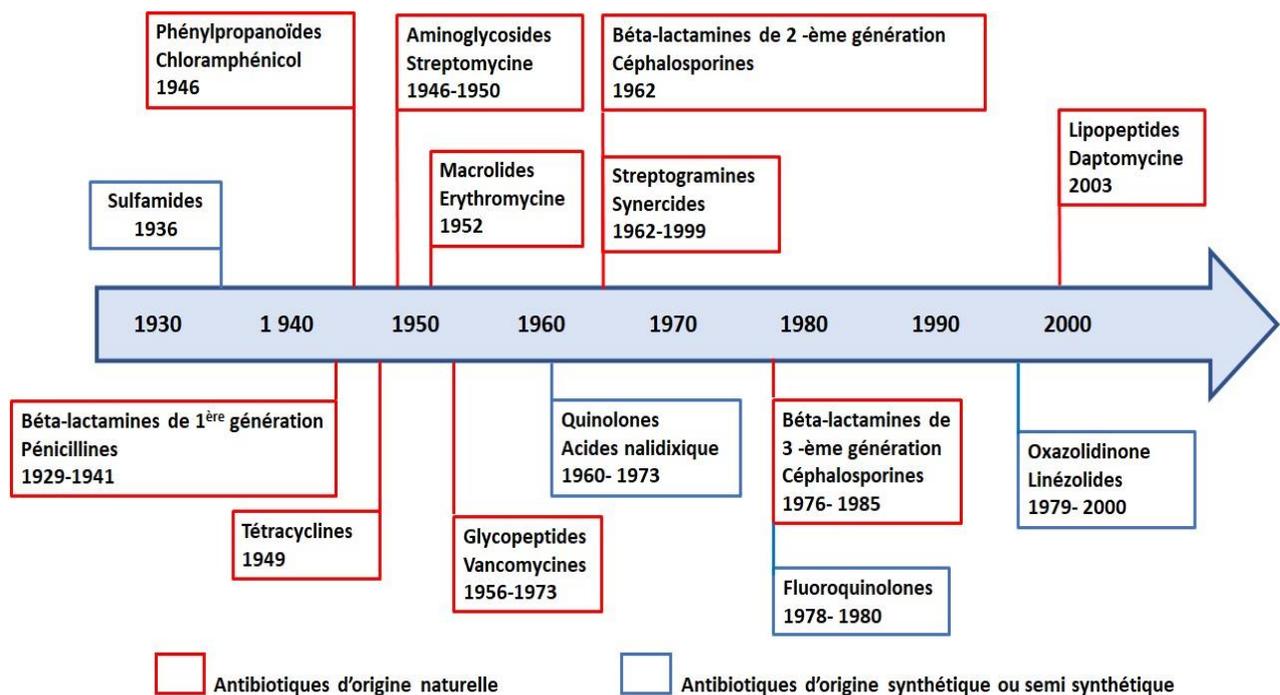
Chapitre I

Etude bibliographique

1. Problématique de la résistance bactérienne

1. 1. Histoire des antibiotiques

La découverte des antibiotiques a complètement révolutionné le domaine médical, leur usage a commencé avec la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 et la démonstration du pouvoir antibactérien *in vivo* par Florey et Chain en 1938 qui marquera l'entrée dans la médecine moderne. L'utilisation des antibiotiques a conduit à une réduction considérable de la mortalité due aux maladies infectieuses causées par les bactéries (Avorn et al., 2001; Lode, 2010). Par la suite, de nombreuses autres molécules antibiotiques ont été découvertes (Figure 1). Cependant, la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques a diminué à la fin de de l'année 1962 (Coates et al., 2011). Ceci a été accompagné par l'augmentation de la consommation de ces molécules en santé humaine, l'agriculture, la pisciculture ainsi que dans l'élevage de fruits de mer (Organisation mondiale de la Santé, 2016). Par conséquent, cette utilisation massive, répétée et non raisonnée a compromis l'efficacité des antibiotiques vis-à-



vis des bactéries ce qui a engendré l'apparition de bactéries résistantes à ces molécules.

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

1. 2. Résistance bactérienne

Dès le début de l'utilisation de la pénicilline contre les bactéries, Abraham and Chain (1940) ont mis en évidence la résistance à cet antibiotique chez *Escherichia coli*. Les bactéries qui ont appris à produire ces molécules ont parallèlement développé de nouveaux mécanismes de résistance pour s'en protéger. On distingue deux types de résistances des bactéries pour les antibiotiques : La résistance naturelle et la résistance acquise.

1. 2. 1. Résistance bactérienne naturelle

Certaines bactéries peuvent être naturellement résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques, c'est une résistance innée et intrinsèque qui se présente chez toutes les souches d'une même espèce bactérienne. Cette résistance permet d'établir le spectre d'activité d'un antibiotique. Comme l'exemple du bacille de la tuberculose qui n'est sensible qu'à quelques antibiotiques bien précis (Ramaswamy and Musser, 1998).

1. 2. 2. Résistance bactérienne acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que certaines souches d'une espèce donnée, c'est lorsqu'une bactérie naturellement sensible à un antibiotique devient résistante à l'antibiotique en question. Elle provient d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de supporter une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe les souches sauvages de la même espèce (Nikaido, 2009; Tenover, 2006). Un exemple est la résistance acquise par *E. coli* sauvage aux pénicillines (amoxicilline ou AMX) et (ticarcilline ou TIC) (Tenover, 2006).

1. 3. Origine de l'émergence des résistances acquises

La bactérie peut acquérir le gène de résistance par plusieurs mécanismes, notamment via une mutation génétique affectant le chromosome de la bactérie, ou bien l'acquisition de matériel génétique étranger (plasmide, transposon) porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance en provenance d'une autre bactérie (Davies and Davies, 2010; Courvalin, 2008) :

- Mutations sur des gènes chromosomiques, spontanées ou induites :
 - ↳ Mutations spontanées : Résulte d'un changement spontané, rare, héréditaire, due au hasard qui affecte la séquence nucléotidique du génome bactérien. Il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique.
 - ↳ Mutations induites : Adaptation de la bactérie lorsque les conditions sont défavorables pour sa croissance tel que la présence d'antibiotiques.
- Acquisition de gènes de résistance provenant d'une autre bactérie :

- ↪ Par conjugaison : Transfert d'ADN d'une bactérie à une autre bactérie via des plasmides ou des transposons par contact direct.
- ↪ Par transduction : Transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre via un bactériophage ;
- ↪ Par transformation : Transfert d'ADN nu de l'environnement entre deux bactéries (transfert intra- ou inter-espèce).

1. 4. Evolution des bactéries multirésistantes aux antibiotiques

Une souche est dite résistante quand elle supporte une concentration d'antibiotique supérieur à celle qui inhibe les autres souches de la même espèce. La fin du XXème siècle a marqué l'évolution et l'apparition des bactéries multirésistantes. Ces bactéries ne sont plus sensibles qu'à un très petit nombre d'antibiotiques. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), ces bactéries multirésistantes sont à l'origine de la mort annuel de 33000 personnes en Europe, avec des conséquences financières annuelle importantes 1milliard d'euros en Europe) (Cassini et *al.*, 2019).

1. 5. Principales bactéries multirésistantes

L'organisation mondiale de la santé a diffusé en février 2017 une liste de bactéries multirésistantes, représentant une menace majeure à l'échelle mondiale :

➤ Urgence critique

- ↪ *Acinetobacter baumannii* : bactérie résistante à de nombreuses classes d'antibiotique, sa contribution aux infections nosocomiales est passée de 2 en 2008 à 11 % en 2011 (Vaux et *al.*, 2012). Elle a tendance à se développer chez les patients immunodéprimés, vulnérables et chez les patients soumis à des procédures invasives et traités par des antibiotiques à large spectre (García-Garmendia et *al.*, 2001). Ainsi, les infections dues à *A. baumannii* sont responsables de pneumonie, infections des voies urinaires et de bactériémie. *A. baumannii* provoque également, quoique moins fréquemment, des infections compliquées de la peau et du système nerveux central (Fournier et *al.*, 2006).
- ↪ *Pseudomonas aeruginosa* : bactérie qui résiste au moins à trois des quatre principales classes d'antibiotiques anti-*Pseudomonas* (pénicillines/ céphalosporines/ monobactames, carbapénèmes, aminosides et fluoroquinolones). Elle a tendance à se développer en particulier chez les

patients atteints de mucoviscidose et dans les services de réanimation (Barbier and Wolff, 2010), pouvant aussi causer des infections nosocomiales, en particulier chez les grands brûlés (Azimi et *al.*, 2019).

↳ Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE) : bactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) de large spectre, à travers la β -lactamase à spectre élargi (BLSE) (Nordmann et *al.*, 2019). Ces bactéries sont les agents les plus récurrents des infections communautaires ou nosocomiales

➤ Urgence élevée

↳ *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques tels que la méticilline, la pénicilline, l'érythromycine et à la tétracycline. SARM est à l'origine de diverses maladies graves telles que les infections osseuses et pulmonaires, ainsi que les septicémies, tant en milieu hospitalier que communautaire (Lowy, 1998). Ces infections sont généralement très graves, avec une mortalité très élevée (Cosgrove et *al.*, 2003; Pickens et *al.*, 2019). En 2005, SARM a été responsable des deux tiers des infections d'origine non hospitalières (Klevens et *al.*, 2007).

1. 6. Mécanismes de résistance

Face aux antibiotiques, les bactéries ont développé de multiples mécanismes de résistance pour faire face aux antibiotiques (Chaussade et *al.*, 2013) (Figure 2) :

- diminution de la pénétration de l'ATB,
- défaut d'affinité cible – ATB via une modification de la cible,
- protection de la cible par une protéine,
- réduction de la perméabilité cellulaire aux ATB,
- inhibition du transport actif des ATB,
- rejet des ATB hors de la cellule par efflux actif grâce à une pompe à protons,
- amplification de la cible de l'ATB,
- inactivation de l'ATB par des enzymes bactériennes.

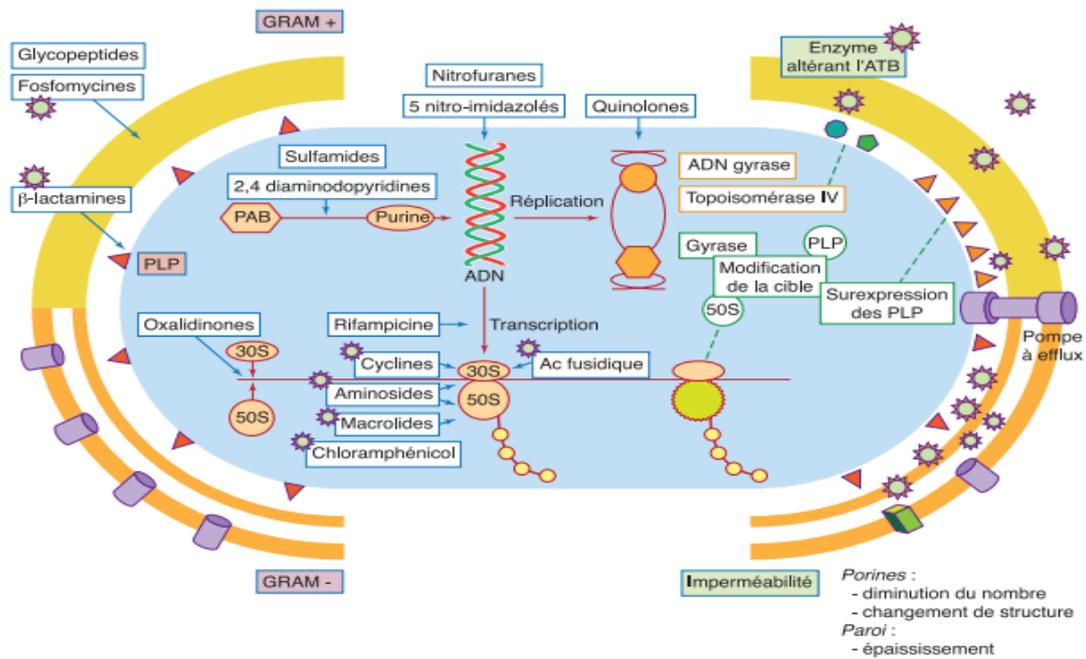


Figure 2. Mode d'action des antibiotiques (Chaussade et *al.*, 2013)

1. 7. Méthodes alternatives à la résistance bactérienne

➤ Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont utilisées en aromathérapie pour leurs activités antiseptiques (Kaloustian et *al.*, 2008). Leur activité antibactérienne a fait l'objet de nombreuses études (Baser and Buchbauer, 2010). Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens (Janssen et *al.*, 1987; Silva and Fernandes Júnior, 2010). Cette activité biologique est principalement liée à la présence de molécules oxygénées qui sont les plus actives contre les microorganismes, principalement les alcools et dans une moindre mesure les aldéhydes et les cétones (Kotan et *al.*, 2007). Ces molécules possèdent un large spectre d'activité antibactérienne contre les bactéries multirésistantes (Benameur et *al.*, 2019; Gadisa et *al.*, 2019).

➤ Phagothérapie

La phagothérapie est une technique découverte en 1917 en France à l'institut Pasteur (Dublanquet, 2014). Il s'agit de l'utilisation de phages, virus lytiques, pour traiter certaines infections d'origine bactérienne (Ravat et *al.*, 2015). Le virus infecte la bactérie, détourne sa machinerie cellulaire pour se reproduire et la détruire par la suite (Krylov, 2001). La phagothérapie a fait la preuve de son efficacité dans le traitement de la peste en Égypte en 1925 et du choléra en Inde en 1926 (Ravat et *al.*, 2015). Malgré cela, son utilisation a diminué après la découverte des antibiotiques.

Actuellement, la situation alarmante vis-à-vis des bactéries multirésistantes impose de trouver des solutions thérapeutiques alternatives. Dans ce contexte, la phagothérapie revient sur le devant de la scène (Breton, 2019). Par ailleurs, plusieurs études ont montré l'efficacité de cette technique vis-à-vis des bactéries multirésistantes telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Vieira et al., 2012), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Tamariz et al., 2014) et *Acinetobacter baumannii* multirésistant (La Vergne et al., 2018). Cependant, le spectre du phage est généralement limité à une espèce bactérienne et parfois uniquement à quelques souches au sein de la même espèce. Ceci limite leur utilisation et implique l'emploi d'une association de phages spécifiques.

➤ Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des molécules d'origine naturelle ayant des propriétés anti-infectieuses, produites par de nombreux types cellulaires et généralement constituées de 12 à 50 acides aminés. Ils ont des structures diverses et ciblent une grande variété d'organismes (Koehbach and Craik, 2019). A l'heure actuelle, plus de 1267 peptides cationiques antimicrobiens (PCAs) ont été isolés de divers organismes (Jourdain et al., 2019), tels que les plantes, les insectes, les mammifères et les virus (Hancock, 2001; Vizioli and Salzet, 2002; Zasloff, 2002).

Plusieurs travaux ont prouvé l'efficacité des peptides antimicrobiens contre différents types d'organismes, comme les bactéries à Gram positif et négatif (Broden, 2005; Hale and Hancock, 2007; Hassan et al., 2012), notamment les bactéries résistantes tel que *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Geitani et al., 2019; Lam et al., 2016). Cependant, les peptides antimicrobiens peuvent être détruits par des protéases secrétées dans le tube digestif (Bourlioux, 2013).

➤ Nouveaux antibiotiques

Les antibiotiques représentent une des plus efficaces classes thérapeutiques. Ils ont permis de soigner un plus grand nombre de maladies liées aux infections bactériennes (Walsh, 2003). Les antibiotiques sont des molécules produites de manière naturelle par les microorganismes champignons, bactéries, actinobactéries, ou par synthèse. Ces molécules agissent à faible dose pour inhiber la réplication d'une bactérie (antibiotique bactériostatique) ou la détruire (antibiotique bactéricide). En revanche, la surutilisation de ces molécules et le manque de développement de nouveaux adjuvants ont altéré leur efficacité (Lieberman, 2003).

Pour cette raison, les recherches actuelles visent à développer des nouvelles classes des molécules avec un mécanisme d'action plus étroit que les antibiotiques classiques (Tableau 1).

Tableau 1. Différentes classes d'antibiotiques utilisées contre les bactéries multirésistantes (Batraud, 2017)

Anciennes classe			Nouvelle classe			
Cible	Classe	Molécule	Cible	Classe	Molécule	
Ribosome	Macrolides	Solithromycine	Molécules agissant sur la paroi cellulaire	Lipoglycopeptides	Telavancine	
		Fidaxomicine			Ramoplanine	
	Oxazolidinone	MRX-1			Dalbavancine	
		Tedizolide		Oritavancine		
		Cadazolide		Pleuromutilines	-	Lefamuline
		Radezolide		Inhibiteur FabI	-	Debio-1452
		LCB01-0371		-	-	Debio-1450
	Aminosides	Plazomicine		-	-	CG400549
	Tétracycline	Omadacycline		HDP-mimetics	-	Brilacidine
		Eravacycline		Inhibiteur de la gyrase	AZD0914	AZD0914
Dérivés des β-lactamines et des inhibiteurs des β-actamases	Sulfactam	BAL 30072	Peptidomimetic	-	POL 7080	
	Cephalosporine	Ceftaroline	Inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne	-	Teixobactin	
	Inhibiteur β -lactamases	RPX7009	Autres	-	Plectasine	
			-	-	-	
Molécules ciblant les topoisomérases	Nouveaux inhibiteurs de GyrA	Gepotidacine				
		Fluoroquinolone	Zabofloxacin			
	Nemonoxacine					
	Avarofloxacin					
	Ou					
	Acorafloxacin					
	Delafoxacin					
	Finafloxacin					
	Gatifloxacin					
	Lipopeptides	Daptomycine				
Surotomycine						
Bicyclolide	EDP-788					

2. Interactions microbiennes

Un écosystème est composé d'organismes vivants macro- ou microscopiques (bactéries, ...) et de leur environnement (air, eau, sol, ...). Les interactions entre les organismes et leur environnement sont nombreuses, complexes et très intenses, favorisant certains groupes de microorganismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne (Curl and Truelove, 1986). Tous les microorganismes sont affectés, directement ou indirectement, par un ou plusieurs autres membres constituants qui peuvent être abiotiques ou biotiques et qui influencent leur développement et leur reproduction (Hug et *al.*, 2012; McCutcheon and von Dohlen, 2011; Schink, 2002; Stolyar et *al.*, 2007).

Ainsi, entre les individus, il existe des interactions biologiques qui peuvent être positives ou négatives selon qu'elles sont bénéfiques pour l'une des espèces et mauvaise pour l'autre (Tableau 2).

Tableau 2. Interactions négatives au sein d'une communauté (Massias, 2008)

Type d'interaction	Bénéfices Symbiote/ hôte	Définition
Amensalisme	+/-	Relation biologique où un être vivant limite le développement d'un autre.
Opportunisme	+/n ou -	Relation biologique où un être vivant profite d'une situation donnée par un autre pour se développer et se reproduire.
Parasitisme	+/-	Relation biologique facultative entre deux êtres vivants mais indispensable à la survie du symbiote qui vit au dépend de son hôte en s'en nourrissant, s'y abritant et s'y reproduisant
Synécrose	-/-	Relation biologique de type compétitive (trophique ou autre) entraînant la mort de deux populations ou groupes de populations d'être vivants.
Prédation	+/-	Type d'interaction biologique, dans lequel une espèce (prédateur) tue et dévore une autre espèce (la proie)

+ : Positif ; - : Négatif ; n=Neutre

2. 1. Interactions négatives

2. 1. 1. *Compétitions*

La compétition est une interaction entre deux espèces ou plus dans laquelle chaque espèce est affectée négativement par la présence des autres espèces en matière de nourriture, substrat, espace, lumière ou autres facteurs environnementaux, qui deviennent limitatifs pour la croissance (Bourlot et *al.*, 2015; Massias, 2008). Il existe deux types de compétitions :

- La compétition intra spécifique qui se produit au sein de la même espèce.
- La compétition interspécifique qui se produit entre des espèces différentes.

Ce type d'interaction est considéré comme une compétition de l'exploitation, car l'utilisation d'une ressource par un microorganisme se fait sans restreindre l'accès à cette ressource à un autre organisme.

2. 1. 2. *Antagonisme*

L'antagonisme est un phénomène où une espèce exerce une action défavorable ou une inhibition vis-à-vis d'une autre au sein d'une population microbienne mixte (Curl and Truelove, 1986). L'antagonisme se traduit généralement par le parasitisme, la compétition et l'antibiose par le biais de la production d'un ou plusieurs antibiotiques (Cook and Baker, 1983). Différents microorganismes sont connus par la production de ces métabolites, tels que *Streptomyces* (De Lima Procópio et *al.*, 2012; Watve et *al.*, 2001), *Bacillus* (Landy et *al.*, 1948; Waghmare et *al.*, 2019) et *Penicillium* (Brian et *al.*, 1957; Broomfield and Simões, 2019).

La production de ces molécules présente un rôle important dans la lutte contre les infections humaines induites par les bactéries pathogènes (Rajivgandhi et *al.*, 2019; Sharma and Manhas, 2019) et la lutte contre les maladies phytopathogènes (Cook and Baker, 1983; Loqman et *al.*, 2009; Raaijmakers et *al.*, 2002). L'antagonisme est une compétition d'interférence où la production de substances biochimiques par un microorganisme limitant le développement d'un autre.

2. 1. 3. *Parasitisme*

Le parasitisme est l'un des premiers termes à avoir été défini et employé pour qualifier une association biologique entre deux organismes. C'est une attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. La mort de l'hôte, par définition, n'est jamais souhaitable ni bénéfique au symbiote, sa vie étant étroitement dépendante de celle de son hôte et de son état de santé. Dans le cas où la mort de l'hôte survient, on parle plutôt de

parasitoïde. Dans ce contexte, l'hôte sert de nourriture à un stade précoce du développement du parasitoïde souvent au stade larvaire (Massias, 2008).

Le parasitisme est considéré comme défavorable pour l'hôte, bien que souvent ce dernier ignore la présence de son symbiote. A la frontière entre prédation et symbiose, le parasitisme est apparu relativement tôt dans l'évolution. Pour certains auteurs (Ewald, 1987), le parasitisme serait une simple évolution de la symbiose, une sorte de transition entre phorésie et commensalisme.

2. 1. 4. Prédation

La prédation est définie comme l'acte d'un organisme, prédateur, tuant et consommant un autre organisme vivant en tant que source d'énergie et de nutriments nécessaire à sa biosynthèse. La proie joue uniquement le rôle de substrat : La proie vit séparément de son prédateur qui vit aussi à l'état libre.

Cette interaction a été largement étudiée dans le règne animal (Finke and Denno, 2004; Ripple and Beschta, 2004; Sinclair et al., 2003), avec peu d'exemples pour les plantes. Alors, qu'elle reste peu étudiée chez les micro-organismes (Jurkevitch, 2007). Au cours des 75 dernières années, des découvertes importantes ont été trouvées sur la prédation des microorganismes par les virus (bactériophages) et les bactéries dans différents type d'écosystèmes naturels et artificiels (Bergh et al., 1989; Curds, 1982; Gonzalez et al., 1990; Parry, 2004; Suttle and Chan, 1994).

3. Bactéries prédatrices

3. 1. Historique

Les bactéries forment quantitativement le groupe majoritaire des microorganismes (Jurkevitch and Jacquet, 2017). En leur sein, les bactéries prédatrices d'autres bactéries ont été fortement sous-estimées par rapport à l'activité de prédation par les virus ou autres prédateurs eucaryotiques (flagellés, cils, champignons). Stolp et ses collaborateurs (Stolp and Petzold, 1962) sont les premiers à avoir découvert par hasard des indices de prédatrices dans le monde bactérien, lors d'une expérience visant à isoler des bactériophages du phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (autrefois *P. glycinea*) d'une suspension du sol. Ainsi, ils ont accidentellement détecté la bactérie Gram-négative *Bdellovibrio bacteriovorus* se fixant sur d'autres cellules Gram-négatives et absorbant le contenu cellulaire. Cette bactérie ne peut pas se développer sans la présence d'une proie. La pénétration de la proie et la nature

intraperiplasmique de *Bdellovibrio* ont, par la suite, été étudiés par Starr and Baigent (1966) et Burnham et al. (1968). Puis, en 1973, l'application de cette bactérie comme agent de biocontrôle a d'abord été menée pour prévenir de la brûlure bactérienne du soja causée par *Pseudomonas syringae* (Scherff, 1973). Ces travaux ont conduit à la découverte d'une diversité de microorganismes actuellement connus sous le nom de *Bdellovibrio* and like Organism (BALO), prédateurs obligatoires répandus, capables apparemment d'attaquer exclusivement la plupart des organismes Gram-négatifs et d'utiliser la proie pour la croissance et la réplication (Davidov et al., 2006; Ruby, 1992). Au cours des dernières années, de nouveaux isolats de bactéries prédatrices ont été attribués au genre *Bdellovibrio*, en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et de leur cycle biologique de prédation (Koval et al., 2013). Cependant, leur diversité est beaucoup plus importante (Baer et al., 2000; Schwudke et al., 2001; Snyder et al., 2002). Aujourd'hui, ils sont classés en deux familles : *Bdellovibrionaceae* constitué du genre original *Bdellovibrio* ; et *Bacteriovoracaceae* comprenant les genres *Bacteriovorax* (qui comprend toutes les souches halophiles) et *Peredibacter*.

En outre, Casida et ses collègues (Casida, 1988, 1980; Germida and Casida, 1983; Zeph and Casida, 1986) ont découvert de nombreux prédateurs non obligatoires des bactéries du sol. Parmi ces prédateurs, *Ensifer* qui est capable de croître en l'absence de proie sur une variété de supports. Cette bactérie, peut se nourrir des cellules de *Micrococcus luteus* en se fixant sur la cellule proie, sans envahir le périplasme ou le cytoplasme de la proie (Casida, 1980).

Plus tard, une autre bactérie prédatrice, nommée *Myxobacteria* a été découverte par Shimkets et Kaiser (Shimkets and Kaiser, 1982). Cette bactérie colonise le sol, s'attaque à un grand nombre de bactéries (Dworkin, 1996; Rosenberg and Varon, 1984), avec un cycle de vie complexe, mais les facteurs écologiques contrôlant leur activité de prédation reste encore peu étudié. Ces résultats ont ouvert la porte à la découverte d'une diversité de bactéries prédatrices (Tableau 3).

Tableau 3. Principales bactéries prédatrices et leurs caractéristiques

Bactéries	Milieux d'isolement	Proie		Stratégie de prédation	Production d'antibiotique	Type de prédation	Références
		Gram +	Gram-				
α-Proteobacteria							
<i>Ensifer adhaerens</i>	Sol	+		Epibiotique	Oui	Facultative	(Casida Jr, 1982 ; Druga et al., 2011 ; Germida and Casida, 1983 ; Yutani et al., 2011)
<i>Micavibrio sp</i>	Sol		+	Epibiotique	Non	Obligatoire	(Davidov et al., 2006 ; Kadouri et al., 2007)
β-Proteobacteria							
<i>Cupriavidus necator</i>	Sol	+	+	Epibiotique	Oui	Facultative	(Kreutzer et al., 2012 ; Makkar and Casida Jr, 1987)
<i>Aristabacter necator</i>	Sol	+	+	Epibiotique	Oui	Facultative	(Cain et al., 2003 ; Casida, 1992)
γ-Proteobacteria							
<i>Lysobacter sp</i>	Sol	+	+	Wolfpack	Oui	Facultative	(Seccareccia et al., 2015 ; Li et al., 2008 ; O'Sullivan et al., 1988)
<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	Sol	+	+	Epibiotique	Oui	Facultative	(Kumbhar and Watve, 2013 ; Nakayama et al., 1999 ; Ryan et al., 2009)
<i>Pseudomonas</i>	Sol	+	+	Epibiotique	Oui	Facultative	(Casida, 1992 ; Shoji et al., 1977)
δ-Proteobacteria							
Bdellovibrionales (d-BALOs)				Periplasmique	Non caractérisé	Obligatoire	(Chen et al., 2012; Kumar et al., 2012; Jurkevitch, 2007; Davidov et al., 2006; Fratamico and Cooke, 1996; Abram et al., 1974)
Bdellovibrionaceae				Epibiotique			
<i>Bdellovibrio spp.</i>			+				
Bacteriovoraceae					Non		

<i>Bacteriovorax</i> sp	Sol, eau dojuce,				Periplasmique			
<i>Peredibacter</i> sp	estuaires, eaux usées, sédiments marins							
Myxobacteria	Sol, fumier, écorce, écorce, sédiments				Wolfpack	Oui	Facultative	(McBride and Zusman, 1996; Reichenbach and Höfle, 1993; Kunze et al., 1989)
Chloroflexi								
<i>Herpetosiphon</i> sp	Eau douce				Wolfpack	Oui	Facultative	(Kiss et al., 2011 ; Nett et al., 2006 ; Quinn and Skerman, 1980 ; Trick and Lingens, 1984)
Bacteroidetes								
<i>Saprospira</i> sp	Sédiments côtiers Eau de mer	+	+		Wolfpack Epibiotique	Oui	Facultative	(Furusawa et al., 2003 ; Saw et al., 2012)
<i>Flavobacter</i>	Eau douce marine	+	+			Oui	Facultative	(Banning, 2010 ; McBride et al., 2009)
Actinobacteria								
<i>Streptomyces</i>	Sol	+	+		Epibiotique	Oui	Facultative	(Casida, 1988; Kumbhar et al., 2014; Waksman and Woodruff, 1941)
<i>Agromyces ramosus</i>	Sol		+		Epibiotique	Oui	Facultative	(Casida, 1983 ; Chernyakovskaya et al., 2004)
<i>Streptoverticillium</i> sp.	Sol	+			Epibiotique	Oui	Facultative	(Arcamone et al., 2000 ; Konev et al., 1978)
Bacillales								
<i>Bacillus</i>	Sol		+		Epibiotique Epibiotique	Oui	Facultative	(Ainsworth et al., 1947 ; Gumbo et al., 2010 ; Katz and Demain, 1977 ; Shoji et al., 1977 ; Stansly and Schlosser, 1947)
<i>Paenibacillus</i>	Sol Eau Rhizosphère Matière végétale		+			Oui	Facultative	(Be'Er et al., 2009 ; Raza et al., 2008)

3. 2. Ecologie des bactéries prédatrices

Les bactéries prédatrices sont largement distribuées dans divers habitats terrestres et aquatiques. En effet, elles ont été isolées ou détectées dans le sol, la rhizosphère, l'eau douce, les étangs, l'eau de mer, les sédiments, le fumier, l'écorce et dans des environnements extrêmes (Jurkevitch, 2007; McBride and Zusman, 1996), où elles exercent une pression mortelle sur leur proie. La plupart des espèces bactériennes ayant des capacités prédatrices ont été isolées du sol, qui comprend de nombreux prédateurs facultatifs comme *Ensifer adhaerens*, *Micavibrio sp.*, *Streptomyces* (Tableau 3). Cependant, leur répartition exacte dans la nature est très peu documentée. Le rôle de ces bactéries prédatrices dans l'écologie des microorganismes et des microbiomes associés à la proie est encore inconnu. L'interaction entre prédateur et proie est connue pour créer des résultats évolutifs profonds pour les espèces participantes (Brodie, 1999).

3. 3. Stratégies de prédatrices utilisées par les bactéries prédatrices

Les travaux qui ont étudié les stratégies utilisées par les bactéries prédatrices sont peu nombreux et seuls quelques travaux ont examiné la classification des stratégies de prédation (Berleman and Kirby, 2009; Keane and Berleman, 2016; Martin, 2002; Z Pasternak et al., 2014; Pérez et al., 2016; Velicer and Mendes-Soares, 2009). La plupart des auteurs proposent 4 stratégies de prédation par les bactéries prédatrices :

➤ Wolfpack

La première stratégie est l'attaque par groupe ou Wolfpack, les bactéries de ce type agissent en tant que groupe, elles chassent collectivement afin d'attaquer leurs proies (Figure 3.a). La stratégie de Wolfpack consiste à lyser les cellules proies de l'extérieur par des molécules très concertées (Martin, 2002). Tout d'abord, ces prédateurs se regroupent et sécrètent en commun une variété de composés diffusibles comme les enzymes lytiques et les antibiotiques qui dégradent et tuent la proie. Par la suite, les proies sont tuées, lysées et digérées en petites molécules pour être consommées (Xiao et al., 2011). En outre, l'augmentation de la densité de cellules prédatrices suggère que les composés antibactériens sécrétés sont plus élevés (Keane and Berleman, 2016). La principale caractéristique distinctive de Wolfpack est que les cellules proies lysées sont consommées à la fois par les cellules sécrétrices du prédateur et par les cellules non sécrétrices (Velicer and Mendes-Soares, 2009).

Les exemples les plus connus utilisant cette stratégie sont *Lysobacter sp.* (Li et al., 2008; Hashizume et al., 2004; Lin and McBride, 1996), *Myxobacteria* (Shimkets et al., 2006;

McBride and Zusman, 1996) et *Herpetosiphon sp.* (Nett et al., 2006 ; Trick and Lingens, 1984) (Tableau 3).

➤ Epibiotique

Cette stratégie exige la proximité des cellules prédatrices et proies (Shi et al., 1993) (Figure 3.b). Lorsque la prédation est extracellulaire ou épibiotique, le prédateur est rattaché à la proie de l'extérieur sans envahir ni le périplasma ni le cytoplasme de la proie sans pénétrer. Le prédateur dégrade et assimile les molécules de la proie via des structures spécialisées (Martin, 2002; Pérez et al., 2016). Ce type de stratégie est utilisé par les bactéries *Ensifer adharens* (Druga et al., 2011; Yutani et al., 2011) et *Streptomyces* (Kumbhar et al., 2014) (Tableau 3).

➤ Invasion directe ou stratégie endobiotique

Cette stratégie de prédation inclut tous les prédateurs qui pénètrent dans le cytoplasme de la proie (Figure 3.c). Cette stratégie est également connue sous le nom d'invasion du cytoplasme (Moulder, 1985). Après la pénétration, le prédateur croît et se divise à l'intérieur du cytoplasme. *Daptobacter* est la seule souche qui utilise cette stratégie (Guerrero et al., 1986) (Tableau 3).

➤ Préplasmique

La cellule prédatrice envahit et se développe à l'intérieur de la proie dans le périplasma (Ferguson, 1990; Ferguson et al., 1992; Hobot et al., 1984) (Figure 3.d). Le prédateur sécrète des enzymes hydrolytiques qui favorisent la pénétration et modifient la paroi cellulaire de la proie (Lerner et al., 2012). Parallèlement, la cellule proie infectée est tuée lorsque la respiration s'arrête et que la membrane externe est modifiée pour former une barrière osmotique (Thomashow and Rittenberg, 1978). Le prédateur envahisseur se fixe à la membrane cytoplasmique de la proie et amorce sa croissance en utilisant le cytoplasme de la proie comme source de nourriture. Par conséquent, le prédateur tue la proie en ingérant son cytoplasme.

Bdellovibrionales (Jurkevitch and Davidov, 2006), *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bacteriovorax marinus*, *Bacteriolyticum stolpii* et *Peredibacter starrii*, utilisent une prédation périplasmique (Pasternak et al., 2014) (Tableau 3).

Certaines bactéries prédatrices peuvent utiliser plus d'une stratégie de chasse, comme *Bdellovibrio* qui utilise une stratégie périplasmique et épibiotique, ainsi que *Myxobacteria* qui peut utiliser à la fois une stratégie épibiotique et Wolfpack.

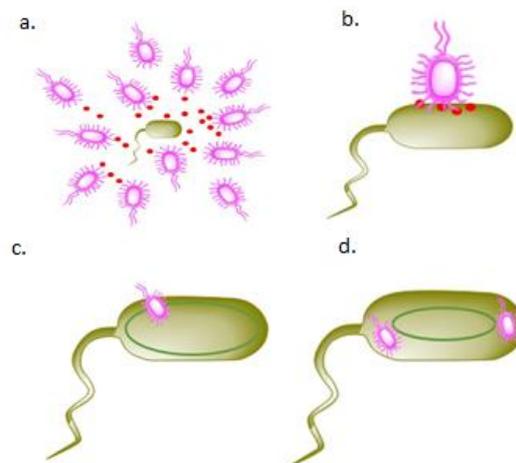
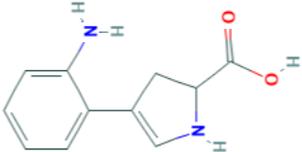
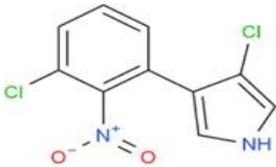
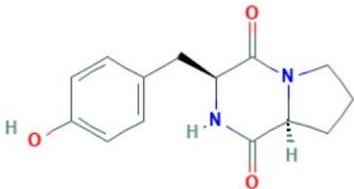
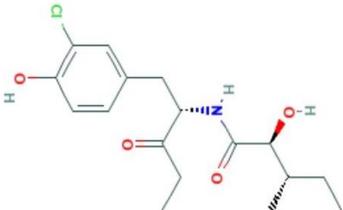


Figure 3. Stratégies utilisées par les bactéries prédatrices.
(a) Wolfpack ;**(b)** Epibiotique ;**(c)** endobiotique et **(d)** Préplasmique

3. 4. Antibiotiques produits par les bactéries prédatrices

Les bactéries prédatrices sont prolifiques et renferment un groupe hétérogène de procaryotes qui a en commun la capacité de consommer d'autres bactéries (Jurkevitch, 2007). A cet égard, certaines de ces bactéries agissent comme chasseurs individuels, d'autres sont connus pour chasser en groupes pour attaquer leur proie (Martin, 2002). Les études suggèrent que cette stratégie de prédation implique généralement la sécrétion d'enzymes lytiques et de petites molécules bioactives comme armes prédatrices (Berleman and Kirby, 2009; Muñoz-Dorado et *al.*, 2016; Reichenbach and Höfle, 1993). Par conséquent, de nombreux nouveaux produits naturels ont été isolés tel que les cystomanamides (Etzbach et *al.*, 2014), les Jahnellamides fdd et les salimyxines (Felder et *al.*, 2013) (Tableau 4). Il est confirmé que cette variété de métabolites secondaires est supposée contribuer à tuer les proies : une déficience dans la biosynthèse de ces composés s'est avérée affecter gravement la performance du prédateur (Xiao et *al.*, 2011). Le tableau 4 présente les différentes molécules produites par ce groupe bactérien.

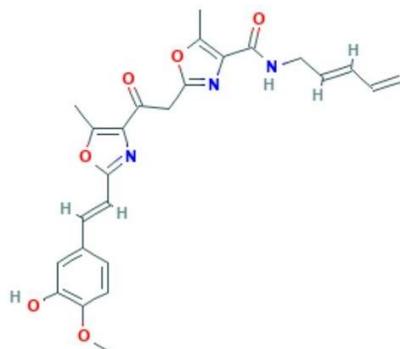
Tableau 4. Métabolites secondaires produits par les bactéries prédatrices et leur activité biologique

Bactérie prédatrice	Molécule	Activité biologique	Références	
<i>Aristabacter necator</i>	Banegasine C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Renforce l'activité antimicrobienne de la pyrrolnitrine	(Cain et <i>al.</i> , 2003)	
				
	Pyrrolnitrin C ₁₀ H ₆ Cl ₂ N ₂ O ₂	Antifongique, antibactérien		
				
	Maculosin C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	Renforce l'activité antimicrobienne de la pyrrolnitrine		
				
<i>Herpetosiphon sp</i>	Auriculamide C ₁₇ H ₂₄ ClNO ₄	Antimicrobien	(Livingstone et <i>al.</i> , 2018 ; Schieferdecker et <i>al.</i> , 2015)	
				

Siphonazole C₂₅H₂₅N₃O₆

Non reporté

(Nett et al., 2006)

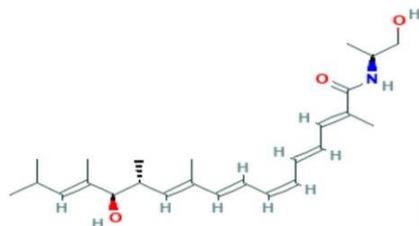


M.xanthus DK1622

Myxalamid B C₂₅H₃₉NO₃

Levure et bactérie à Gram positive

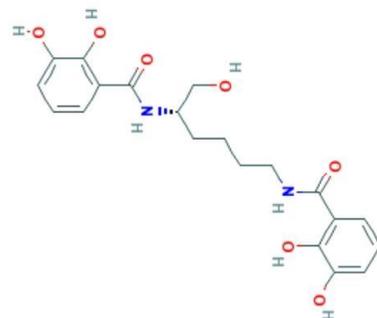
(Gerth et al., 1983)



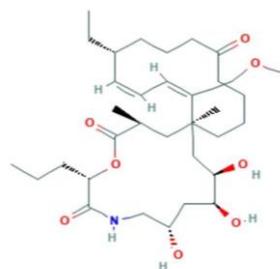
Myxochelin A C₂₀H₂₄N₂O₇

Antibactérien et antitumoral

(Miyanaga et al., 2006 ; Krug et al., 2008 ; Kunze et al., 1989)



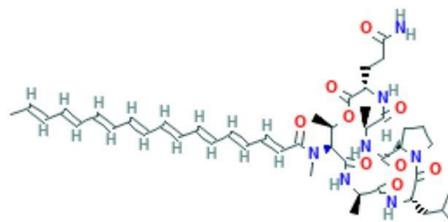
Myxovirescin A1 C₃₅H₆₀N₈O₈



Bactéricide pour de nombreuses bactéries Gram-négatives, entérobactéries, et à 20 à 50 µg/mL, il inhibe également certaines *pseudomonades* et bactéries Gram-positives

(Xiao *et al.*, 2012 ; Gerth *et al.*, 1982)

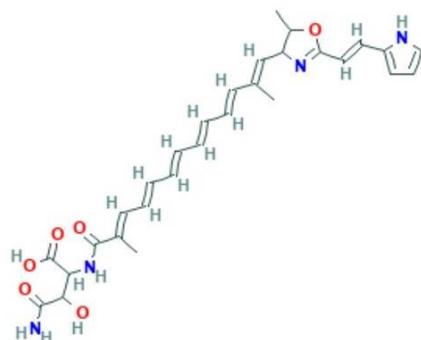
Myxochromide A3 C₄₅H₆₃N₇O₉



Non reporté

(Korp *et al.*, 2016)

DKxanthene-534 C₂₉H₃₄N₄O₆



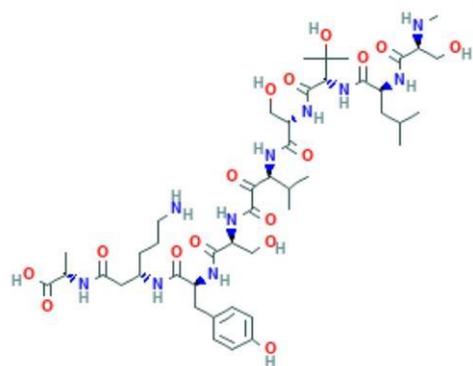
Activité antioxydante

(Wenzel and Müller, 2009 ; Meiser *et al.*, 2006)

Myxoprincomide C₄₅H₇₄N₁₀O₁₆

Non reporté

(Cortina et al., 2012)

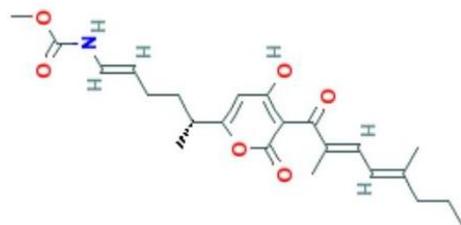


Myxococcus fulvus Mxf50

Myxopyronins A C₂₃H₃₁NO₆

Antibactérien

(Irschik et al., 1983 ; Kohl et al., 1983)



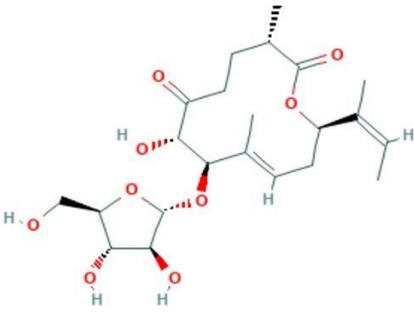
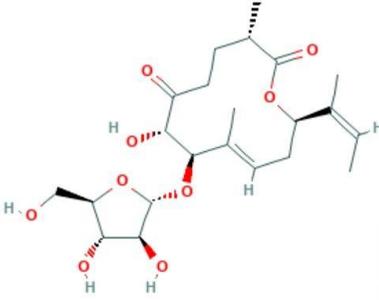
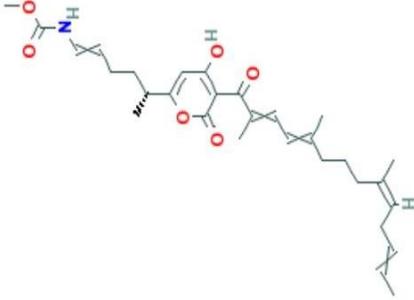
Streptomyces althioticus
Myxococcus
Virescens M.xanthus
Cystobacter

Althiomycin C₁₆H₁₇N₅O₆S₂

Antibactérien et inhibe sélectivement la synthèse protéique bactérienne

(Kunze et al., 1982 ; Fujimoto et al., 1970; Yamaguchi et al., 1957)



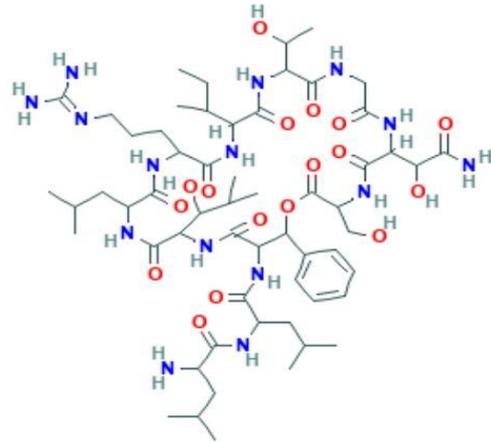
Myxobacterium	Gulmirecin B $C_{22}H_{34}O_9$	Antibactérien	(Schieferdecker et al., 2014)
			
Myxobacterium <i>Pyxidicoccus fallax</i> HKI 727	Gulmirecin A $C_{27}H_{42}O_{11}$	Antibactérien	
			
Corallocooccus coralloides	Precorallopyronin A $C_{30}H_{41}NO_6$	Non reporté	(Korp et al., 2016 ; Schäberle et al., 2015)
			

Lysobacter spp

Lysobactin C₅₈H₉₇N₁₅O₁₇

Antibactérien

(O'Sullivan et al., 1988)

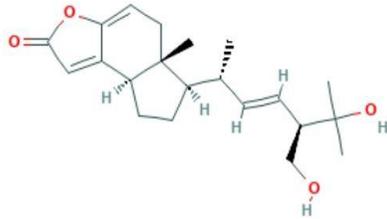


Myxobacterium
Enhygromyxa salina

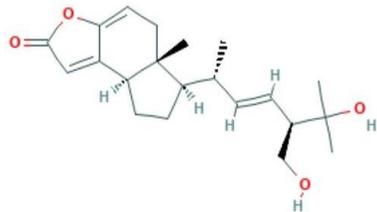
Salimyxin A C₂₁H₃₀O₄

Antibactérien

(Felder et al., 2013)



Salimyxin B C₂₁H₃₂O



4. Actinobactéries

4. 1. Généralités

Les actinobactéries représentent un vaste groupe de procaryotes constituant l'ordre des actinomycétales (Mariat and Sebald, 1990), leur découverte est à l'origine de celle de l'actinomycine par Waksman et Woodruff en 1940 à partir d'une culture de *Streptomyces antibioticus* et de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (Schatz et al., 1944).

Les actinobactéries sont des bactéries Gram positifs avec un haut coefficient de Chargaff (% GC) généralement compris entre 60 et 75 %, leur croissance avec un temps de génération moyenne de 2 à 3 heures est plus lente que celle des autres bactéries (Larpen and Sanglier, 1989). Ces bactéries se caractérisent par un phylum grand et complexe (Stackebrandt et al., 1997; Zhi et al., 2009), qui ne subit normalement pas de fragmentation et produisant des spores asexuées.

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses formées par un réseau ramifié d'hyphes (divisés généralement par des septums), se développant à la fois à la surface et à l'intérieur du substrat, pendant une semaine ils forment sur milieu solide des colonies souvent pigmentées (vert, gris, rouge ...) qui sont à l'origine de l'accumulation d'hyphes qui irradient, par croissance centrifuge le germe qui leur donne naissance. Les actinobactéries possédant un véritable mycélium non fragmenté et sporulant sont les formes les plus évoluées comme le genre *Streptomyces* au contraire des moins évoluées qui sont des bâtonnets ou plus rarement un mycélium rudimentaire comme le genre *Mycobacterium*. Les actinobactéries ont souvent été confondues avec les mycètes du fait de leur morphologie fongicoïde (présence de filaments ramifiés, sporulation) et aussi à cause de l'allure mycosique des maladies que certaines provoquent (Reponen et al., 1998), ce qui explique leur dénomination. En effet, le mot « Actinomycètes », composé de deux substantifs grecs *actino* et *mycete* signifie champignons à rayon ou champignons rayonnants. Cependant, malgré ces ressemblances les actinobactéries ne possèdent pas de membrane nucléaire, elles renferment des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. Elles sont, pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens ; le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons (Gottlieb, 1973). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (existence d'espèces anaérobies strictes, sensibilité à des actinophages...) affirment leur classification parmi les bactéries (Demain and Solomon, 1985; Mariat and Sebald, 1990).

Les actinobactéries sur le plan morphologique regroupent à la fois des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres au mycélium fugace ou encore des espèces au mycélium développé et persistant comme le Genre : *Streptomyces* (Goodfellow and Williams, 1983).

Les actinobactéries ont une paroi cellulaire qui ne contient ni chitine ni cellulose mais plutôt une glycoprotéine renfermant de la lysine ou de l'acide diaminopimélique et leur cytologie est similaire à celle des bactéries (Lechevalier and Lechevalier, 1970; Mariat and Sebald, 1990).

Généralement, la plupart des actinobactéries sont des hétérotrophes et exigent des composés organiques (l'amidon de maïs, le glucose, le fructose, le saccharose et la mélasse qui sont rapidement assimilés) comme source de carbone et d'énergie, mais il existe des espèces qui sont capables de croissance chimio-trophique (Ensign et al., 1993).

4. 2. Historique

La découverte, la caractérisation, la nomenclature et l'utilisation des actinobactéries se déclinent en 5 périodes :

- La première période (1874-1900) ou période médicale, s'est intéressée exclusivement aux organismes pathogènes et à leur rôle dans les pathologies. Cette période a commencé par la découverte du premier actinobactérie *Streptothrix foeresteri* par Cohn en 1875 (Anibou, 2008).
- La seconde période (1900-1940) est caractérisée par la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinobactéries et les premières tentatives pour la distinction entre les groupes pathogènes et saprophytiques (Baldacci, 1962).
- La troisième période est caractérisée par la découverte des antibiotiques produits par les actinobactéries en 1943. Cette période a vu l'augmentation du nombre des espèces, les brevets des spécialités antibiotiques et les règlements qui dirigent les nouvelles espèces (Baldacci, 1962).
- 1943 : Waksman et Henrici créent le genre *Streptomyces* (combinant les noms des genres *Streptothrix* et *Actinomyces*) qui regroupe les actinobactéries dont le mycélium aérien produit des chaînes de spores portées par des sporophores.
- 1944 : découverte de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (Le Minor et al., 1989; Sanglier and Trujill, 1997).
- La quatrième période (1940-1970) débute par la constatation que le même

antibiotique peut être produit par différentes actinobactéries. Cette période est caractérisée par la révision des travaux accomplis et des règles de nomenclatures. Ainsi c'est la période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinobactéries.

- La cinquième période qui débute dans les années 1960 voit le début de l'utilisation des méthodes génétiques par Hopwood (Chater, 1999; Hopwood, 1973). La génomique (Hopwood, 2003) a bouleversé la classification des espèces (Ventura et al., 2007) et d'étude de l'utilisation biotechnologique de ces microorganismes.

4. 3. Morphologie des actinobactéries

2 groupes morphologiques peuvent se distinguer :

- Le premier a des caractéristiques morphologiques particulières et est formé par un ensemble de filaments ramifiés sous forme d'une masse (Mycélium).
- Les microorganismes du deuxième groupe sont typiquement plus complexes par rapport au premier groupe (Lechevalier and Lechevalier, 1985). On peut y rencontrer des bacilles et des coccobacilles comme *Rhodococcus* et *Mycobactérium* (Avril, 1992).

L'analyse par imagerie des hyphes des actinobactéries indiquent l'existence de deux catégories de filaments (Figure 4) :

- Pellet : un agrégat de plusieurs hyphes enchevêtrés, leurs diamètres peuvent varier de plusieurs micromètres à plusieurs millimètres.
- Hyphes dispersés : se présentent sous deux formes « freely dispersed » et « mycélium clumps ou agrégate » (Cox et al., 1998).

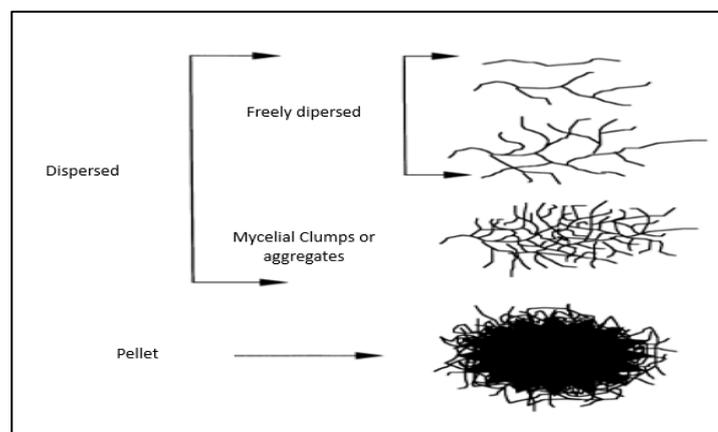


Figure 4. Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Alonso, 2007)

Le mycélium des actinobactéries présente une diversité morphologique (Figure 5) :

- ↪ Les espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*) ;
- ↪ Les espèces au mycélium fugace, qui se fragmente (certaines *Nocardia*) ;
- ↪ Les espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces*.

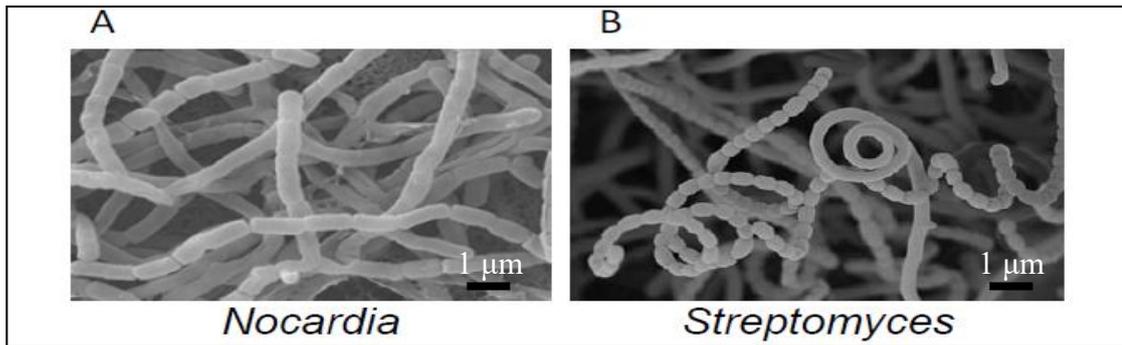


Figure 5. Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinobactéries. (A) Bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent, (B) Bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1 µm (Belyagoubi, 2014)

Les actinobactéries sont caractérisées par la formation d'un réseau ramifié d'hyphe sur un substrat solide, ce réseau se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former un mycélium végétatif et appelé aussi le mycélium du substrat ou mycélium primaire (Figure 6) (Prescott et *al.*, 2003).

Ainsi, lorsque le mycélium du substrat se développe vers la partie superficielle, il donne lieu au mycélium aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, qui sont des agents de dissémination (Smaoui, 2010).

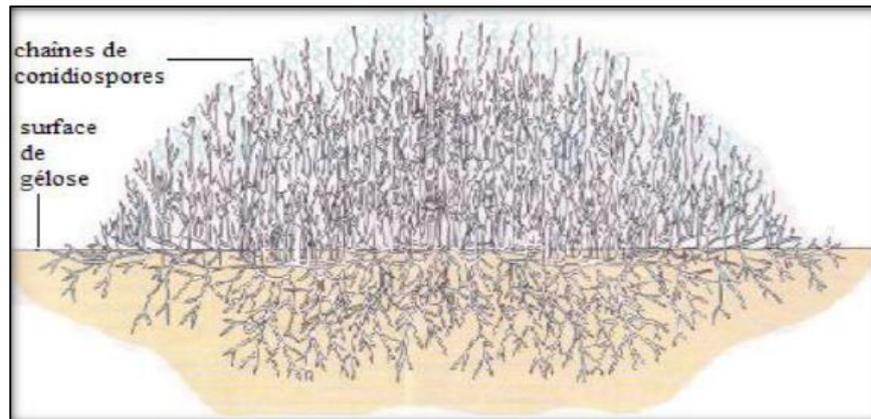


Figure 6. Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs) (Prescott et *al.*, 2003)

4. 4. Taxonomies des actinobactéries

4. 4. 1. Ordre des *Actinomycétales*

Les actinobactéries sont raccordées au phylum des *Actinobacteria*, qui réunit une seule classe : *Actinobacteria*, cette classe est fractionnée en 5 sous-classes, 6 ordres dont l'ordre des *Actinomycétales* (Figure 7). Ce dernier est composé par 9 sous-ordres qui regroupent des bacilles et des coques à Gram positif variés.

Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par une grande teneur en G+C %, allant de 51 % chez certaines *Corynebactéries*, à plus de 70 % chez les genres *Streptomyces* et *Frankia* (Ventura et *al.*, 2007) et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie aux sous classes des *Actinobacteridae* et à l'ordre des *Actinomycétales* créé par Buchanan en 1917 (Ludwig et *al.*, 2012; Parte, 2012).

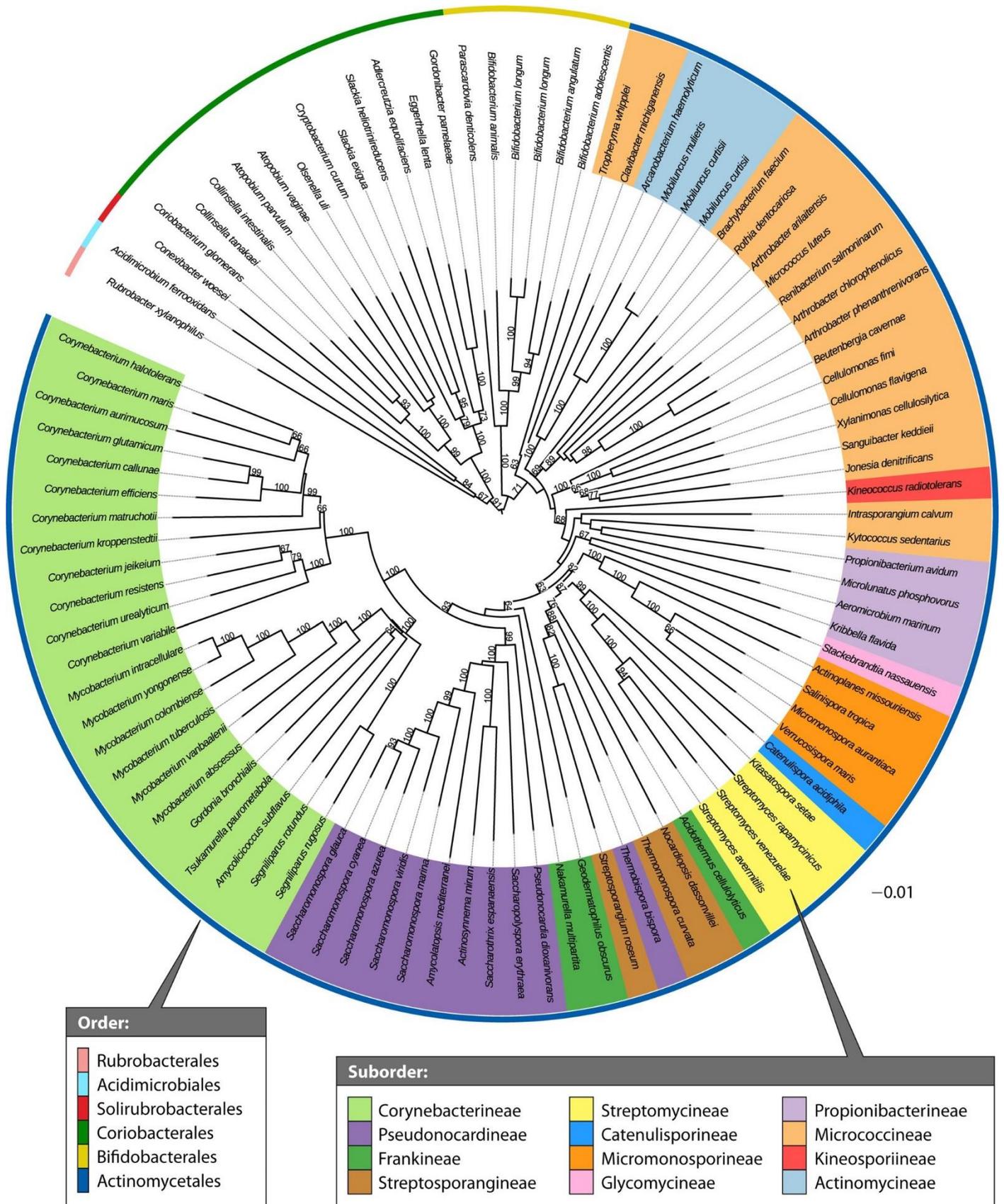


Figure 7. Arbre phylogénétique basé sur 97 séquences du génome des actinobactéries (Ait Barka *et al.*, 2016)

4. 4. 2. Taxonomie des actinobactéries

Depuis plusieurs décennies, la classification des actinobactéries est passée par plusieurs étapes en fonction de l'avancée des connaissances. Depuis 1940, elle a pris de l'ampleur et ne cesse d'être corrigée (Belyagoubi, 2014). Selon Lechevalier et Lechevalier (1965), la classification des espèces est basée sur des critères morphologiques et chimiques. En outre, à cause de leur diversité les approches physiologique, numérique et moléculaire sont devenues indispensables pour différencier entre les actinobactéries.

➤ Critères morphologiques

L'étude morphologique des actinobactéries selon Badji (Badji et *al.*, 2006) est basée sur les caractères morphologiques importants, comme le type (fragmenté ou pas) et la couleur du mycélium aérien ainsi de substrat, la présence ou non de sporophores sur le mycélium, la présence de sclérotés ou de synnemata, la présence et la forme des spores (Figure 8) ainsi que leur mobilité, leur disposition sur les hyphes et leur nombre, la présence ou non de sporanges et leurs type (Figure 9) et finalement la production et la couleur des pigments solubles sécrétés (PS).

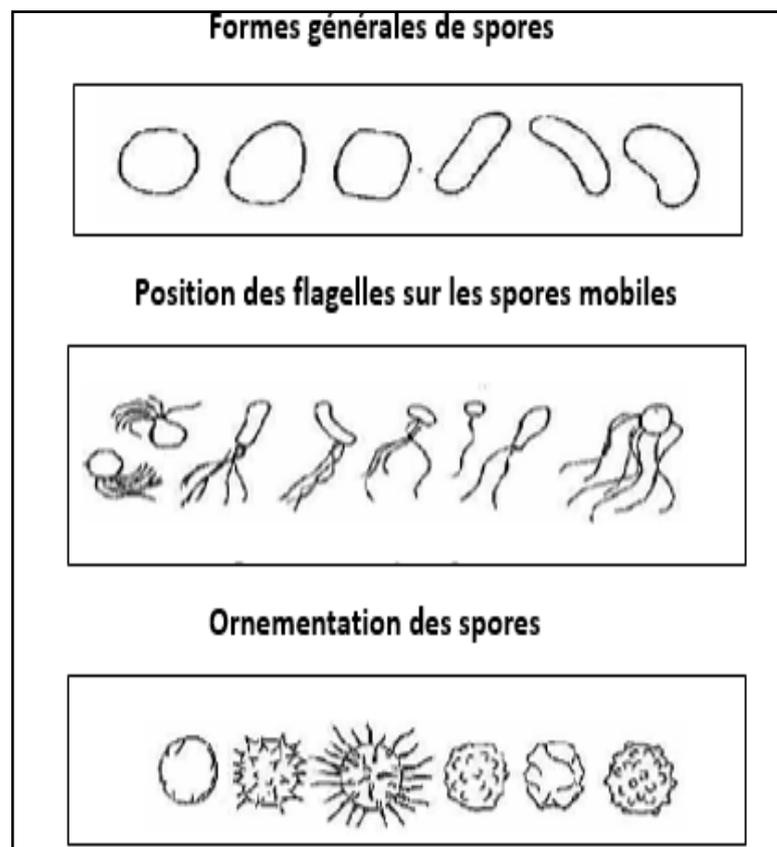


Figure 8. Morphologie des spores des actinobactéries (Breton and Theilleux, 1989)

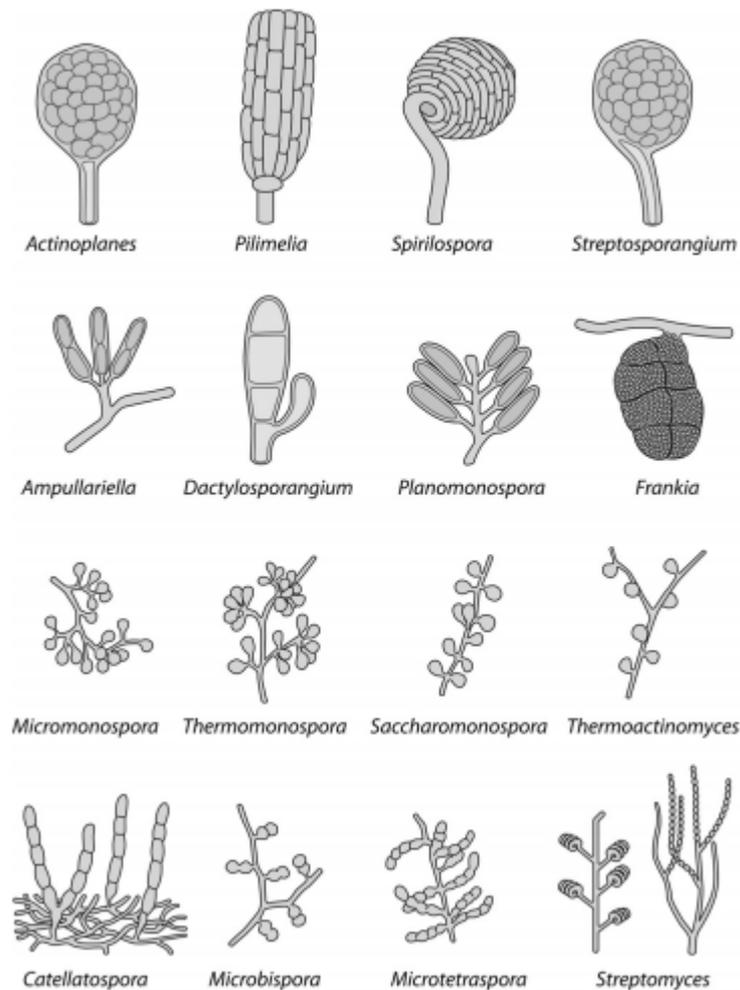


Figure 9. Différentes chaînes de spores chez les actinobactéries (Ait Barka et al., 2016)

La classification parfois des souches peut être basée uniquement sur des critères micromorphologiques à titre d'exemple les genres : *Micromonospora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc.

➤ Critères chimiotaxonomiques

Les caractères morphologiques sont suffisants pour la reconnaissance de certains genres. Par contre, la grande majorité (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Nocordioides*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Soccharothrix*, *Kitasatosporia*, *Glycomyces*, ... etc.) nécessite une étude chimique des constituants cellulaires (Boudjella, 2007). En effet, les caractères morphologiques adoptés par la classification classique dépendent de la nature des composés chimiques des microorganismes (O'Donnell, 1988).

Selon Goodfellow & Minnikin (1985), l'étude chimiotaxonomique des actinobactéries consiste en l'observation des variations chimiques dans les organismes et l'utilisation de caractères chimiques dans la classification et l'identification, afin d'identifier les genres et les groupes d'actinobactéries.

Les caractères pris en compte dans l'étude chimiotaxonomique sont les composés majoritaires de la paroi cellulaire, tels que les acides aminés pariétaux et les lipides des enveloppes cellulaires au niveau de la paroi cellulaire (Lechevalier, 1980).

Les principaux critères chimiotaxonomiques adoptés dans la classification des actinobactéries sont :

- Composition du peptidoglycane
- Composition en sucres cellulaires
- Composition phospholipidique des membranes
- Production d'antibiotiques
- Tests biochimiques : Réduction du nitrate / Hydrolyse de l'urée / Hydrolyse de l'acide hyppurique / Synthèse de mélanine (*Streptomyces*) (Larpen and Sanglier, 1989; Lechevalier et al., 1977; Staneck and Roberts, 1974).

Les études effectuées par Romano and Nickerson (1956), Cummins and Harris (1958) et Hoare and Work (1957) rapportées par Becker et al. (1965) ont prouvé que les actinobactéries ont une paroi cellulaire de composition très proche de celle des bactéries à Gram positif et ont également signalé que la composition chimique de la paroi cellulaire peut fournir des méthodes pratiques afin de différencier les genres d'actinobactérie.

Becker et al. (1965), Yamaguchi (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970) ont divisé les actinomycètes en chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires.

L'acide diaminopimélique (DAP) est un constituant qui se présente au niveau des parois de la plupart des actinomycètes sous deux formes isomériques : la forme LL et la forme DL ou meso. Les parois sont classées en huit groupes chimiques ou chémotypes pariétaux en fonction de leur composition en DAP mais aussi en d'autres acides aminés (Tableau 5) :

Tableau 5. Différents types de parois et leurs constituants majoritaires chez les actinobactéries (Loqman, 2009)

Type de paroi	Constituants pariétaux majeurs	Genres représentatifs
I	L-DAP + Glycine	<i>Arachnia, Pimelobacter, Nocardioides, Streptomyces</i>
II	Méso-DAP+ Glycin	<i>Actinoplanes, Actinomyces</i>
III	Méso-DAP	<i>Dermatophilus, Maduromyces, Frankia, Geodermatophilus, Thermonospora, Kitasatospira, Spirillosporia, Thermoactinomyces</i>
IV	Méso-DAP + Arabinose, galactose	<i>Micropolyspora, Nocardioformes</i>
V	Lysine + Ornithine	<i>Actinomyces</i>
VI	Présence variable de l'acide Aspartique et de galactose	<i>Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora, Actinomyces, Arcanobacterium</i>
VII	Acide diaminobutyrique + Glycine	<i>Agromyces, Calvibacter</i>
VIII	Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

Les actinobactéries peuvent aussi se classifier selon la composition et la structure du peptidoglycane, tel que proposé par Schleifer and Kandler (1972) qui introduisent une nomenclature à trois caractères :

- ↪ Une lettre capitale correspondant à l'appariement des acides aminés impliqués dans la liaison entre chaînes peptidiques (A pour une liaison entre les acides aminés 3 et 4, B pour liaison entre les acides aminés 2 et 4),
- ↪ Un chiffre correspondant au type de pont entre acides aminés liés
- ↪ Une lettre grecque relative à la nature de l'acide aminé en position 3. Cette nomenclature est peu utilisée pour les actinomycètes étant donné qu'on rencontre principalement l'appariement 3-4 des acides aminés chez ces bactéries (Vollmer et al., 2008).

➤ Critères physiologiques

La classification des actinobactéries selon les critères physiologiques est basée sur des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme

la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc.).

4. 4. 3. Critères moléculaires

Ces dernières décennies, la biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant et incontournable en taxonomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer une nouvelle espèce sans effectuer des analyses génétiques.

Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont l'hybridation ADN-ADN (Wayne et *al.*, 1987), le séquençage de l'ADN ribosomique 16S par la méthode de Stackebrandt et *al.* (1997) et le pourcentage GC % qui n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition de nouveaux genres. Ces critères ont permis de tracer toute la phylogénie des actinobactéries.

4. 5. Ecologie des actinomycètes et leur distribution dans le milieu marin

Les actinobactéries sont des microorganismes omniprésents au niveau de tous les substrats naturels et en particulier le sol (Lacey, 1973; Larpent and Sanglier, 1989; Porter, 1971; Williams et *al.*, 1984). La grande majorité est d'origine tellurique 10 à 20 % ou parfois plus (Dommergues and Mangenot, 1970; Ishizawa and Araragi, 1976), ainsi elles sont capables de se développer sur une large gamme de substrats (Tableau 6). Elles peuvent coloniser de nombreux biotopes : air, composts, eau, fourrages, fumiers, grains, canne à sucre, etc.) et peuvent se retrouver dans des zones géographiques variées. On en trouve ainsi dans l'extrême nord, l'arctique, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts (Lacey, 1973), les sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés. Au contraire, les espèces anaérobies appartenant aux genres *Actinomyces*, *Arachnia* et groupes voisins font partie de la flore endogène de Veillon et ne se trouvent généralement dans la nature que dans les endroits récemment contaminés par l'homme (Mariat and Sebald, 1990; Sanglier and Trujill, 1997).

Tableau 6. Répartition des actinobactéries dans la nature
(Goodfellow and Williams, 1983)

Genre	Habitats
<i>Actionomadure</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines des non-légumineuses
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau, sédiments, les sols humides
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporanguim</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation
<i>Nocardia amarae</i>	Les boues activées

Les actinobactéries ont également été isolées à partir de nombreux environnements aquatiques :

- Eau douce (Kitouni et *al.*, 2005);
- Eau issue de marécages salés (Al-Zarban et *al.*, 2002).
- Eau de mer et de sédiments marins (Bull and Stach, 2007; Ghanem et *al.*, 2000; Jensen et *al.*, 1991; Ward and Bora, 2006);

Les actinobactéries peuvent être hébergées dans les différents compartiments du milieu marin: le fond de l'océan (Fenical and Jensen, 2006; Jensen et *al.*, 2005), l'océan et les zones intertidales (Goodfellow and Williams, 1983), l'eau de mer (Ramesh and Mathivanan, 2009), les animaux et les plantes (Castillo et *al.*, 2005; Liu et *al.*, 2019; Zhang et *al.*, 2008), les sédiments océaniques (Claverías et *al.*, 2019; Das et *al.*, 2008; Jensen et *al.*, 2005; Sun et *al.*, 2010). Les actinobactéries colonisant les milieux marins peuvent être d'origine terrestre, provenir du lessivage des spores en dormance, d'autres espèces sont indigènes.

Les actinobactéries sont aussi importantes en écologie qu'en médecine. Les actinobactéries marines contribuent à la décomposition de la matière organique (Steger et *al.*, 2007), à la solubilisation du phosphore (Hamim et *al.*, 2019), au contrôle phytopathologique, à la production de composés antifongiques (Djinni et *al.*, 2019; Escalante-Réndiz et *al.*, 2019; Loqman et *al.*, 2009; Ouhdouch et *al.*, 2001) et de substances biologiquement actives tels les antibiotiques, les vitamines et les enzymes (Hamedi et *al.*, 2019; Ouchari et *al.*, 2019; Tischler et *al.*, 2019).

4. 6. Cycle de développement

Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinobactéries possèdent un cycle de vie qui est le fruit de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (Ait Barka et *al.*, 2016).

Les actinobactéries présentent un cycle biologique semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique sans noyau distinct, les a classés parmi les bactéries. La Figure 10 montre le cycle de développement des actinobactéries. Sur un milieu solide, le cycle commence par la germination d'une spore qui donne lieu à un mycélium végétatif formé d'hyphes multi-nucléoïde, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium végétatif, en utilisant ce dernier comme substrat. En effet, le mycélium végétatif s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien (Miguélez et *al.*, 1999). La croissance des hyphes est apicale (se fait par le sommet) (Flärdh, 2010) et s'accompagne de la formation de septa, conduisant à des unités uni-génomiques. Les cellules se différencient ensuite pour former des spores. Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporangiospores.

Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative, les actinobactéries sont immobiles, excepté pour les spores de certains genres (*Actinoplan*, *Spirillospora*...etc.) (Prescott et *al.*, 2007).

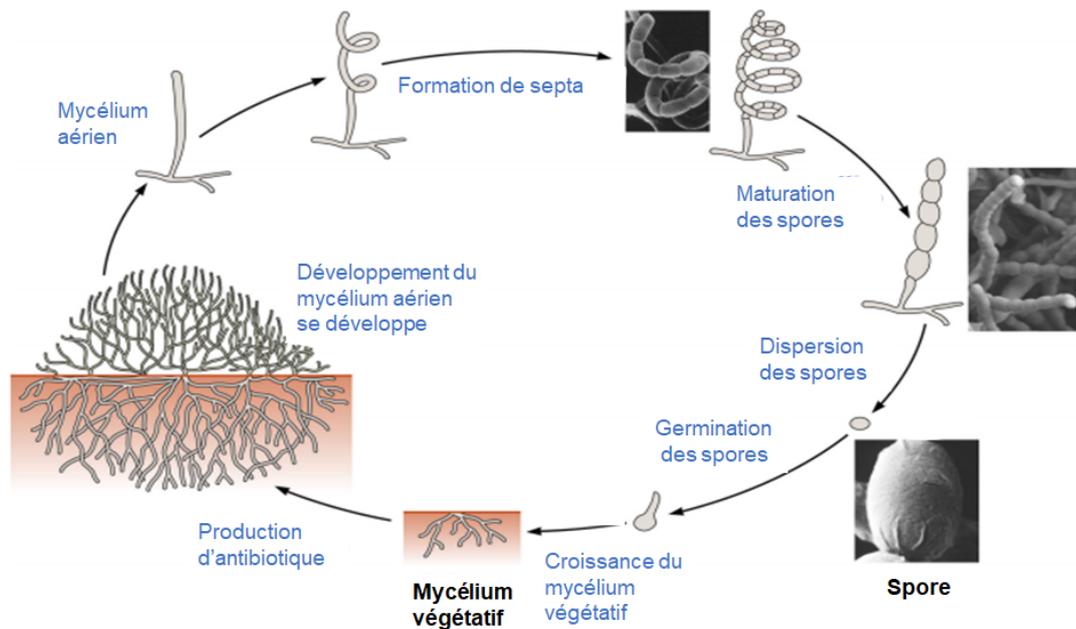


Figure 10. Cycle de développement des actinobactéries (Ait Barka et *al.*, 2016)

4. 7. Métabolisme des actinobactéries

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire se met en place donnant lieu à la biosynthèse de composés d'une extraordinaire diversité de structures et d'activités biologiques (Choulet et *al.*, 2006).

4. 7. 1. Métabolisme primaire

Le métabolisme primaire des actinobactéries est semblable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires ou généraux essentiels forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (Theilleux et *al.*, 1993).

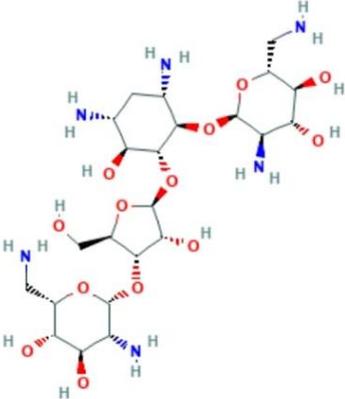
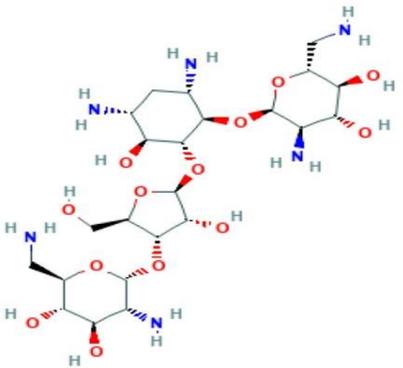
4. 7. 2. Métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (Theilleux et *al.*, 1993). De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas des fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (Colombié, 2005).

4. 8. Antibiotiques produits par les actinomycètes marins

Les actinobactéries constituent une source importante d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires à utilité industrielle (Hayakawa et *al.*, 2004; Takahashi and Omura, 2003). Plus de 70 % des antibiotiques d'origine microbienne sont produits par ce vaste groupe bactérien (Cundliffe, 2006) (Tableau 7). Les actinobactéries produisent un grand nombre d'antibiotiques de structure chimique très variées (aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, beta-lactamines, tetracyclines, macrolides, nucléosides ...) qui ont de nombreuses applications thérapeutiques (Okami and Hotta, 1988).

Tableau 7. Liste des antibiotiques produits par les actinobactéries marines (Kokare, 2008)

Antibiotique	Souches productrices	Source	Année
<p>Neomycin B $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$</p>	<i>S. marinensis</i>	Eau de mer	1974
			
<p>Neomycin C $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$</p>	<i>S. marinensis</i>	Eau de mer	1974
			

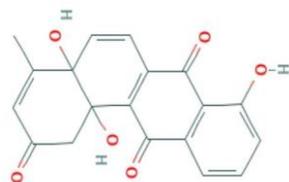
SS-228Y

Chainia SS-228

La boue de la mer

1975

$C_{19}H_{14}O_6$



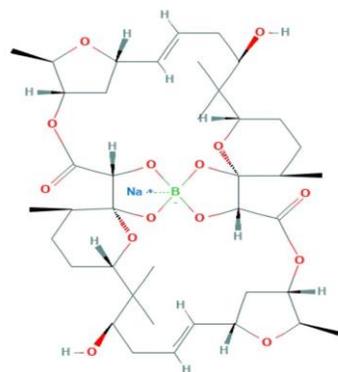
Aplasmomycin

S. griseus SS-20

La boue de la mer

1977

$C_{40}H_{60}BNaO_{14}$



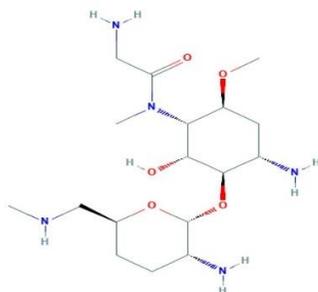
Istamycin A

S. tenjimariensis SS-939

La boue de la mer

1980

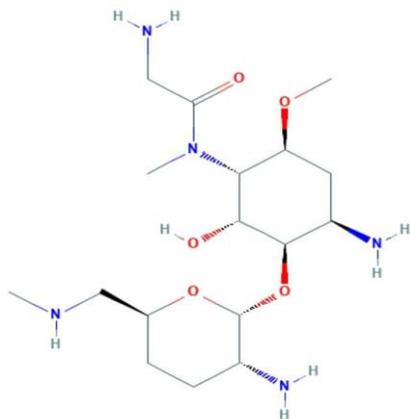
$C_{17}H_{35}N_5O_5$



Istamycin B*S.tenjimariensis* SS-939

La boue de la mer

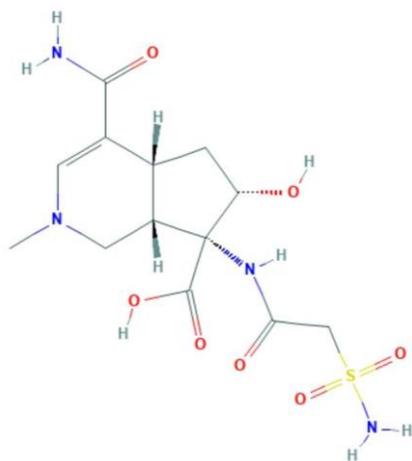
1980

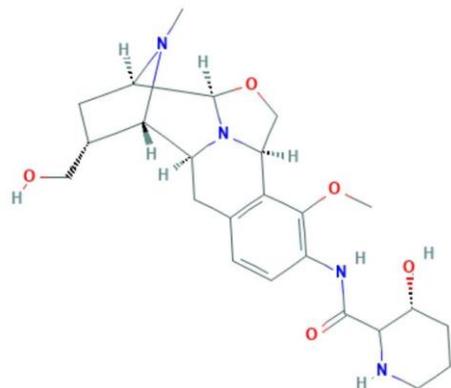
 $C_{17}H_{35}N_5O_5$ 

Altemicidin*S.sioyaensis* SA-1758

La boue de la mer

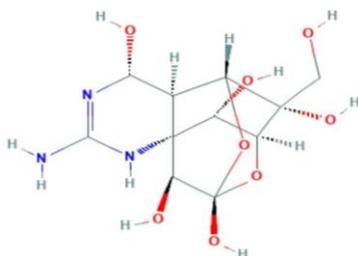
1989

 $C_{13}H_{20}N_4O_7S$ 

Tetrazomine $C_{24}H_{34}N_4O_5$ *Actinomyces* Y-09194L

Sédiments marins

1991

Tetrodotoxin $C_{11}H_{17}N_3O_8$ *Streptomyces* species

Sédiments marins

1991

Urauchimycin A $C_{22}H_{30}N_2O_8$ *Streptomyces* sp. Ni-80

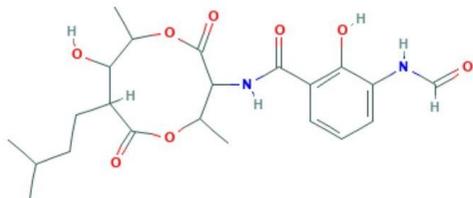
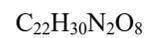
L'éponge

1993

Urauchimycin B*Streptomyces* sp. Ni-80

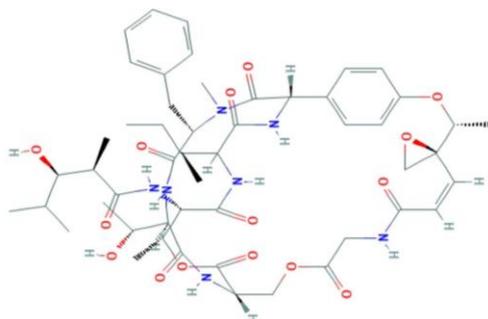
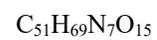
L'éponge

1993



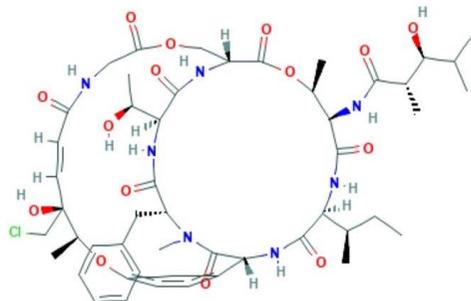
Salinamide A*Streptomyces* speciesSurface du gel des
poissons

1994



Salinamide B*Streptomyces* speciesSurface du gel des
poissons

1994

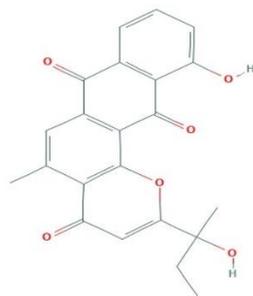
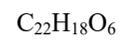


γ -Indomycinone

Streptomyces sp. B-8300

Sédiments marins

1997



4. 9. Actinobactéries prédatrices

Les actinobactéries ont un métabolisme secondaire bioactif élevé, produisant ainsi une importante quantité d'antibiotiques d'origine naturelle (Hoshino et *al.*, 2015b). Ces molécules sont produites par les *actinobactéries* pour inhiber la croissance des autres microorganismes avec lesquels elles sont en compétition dans leur biotope (Ortiz-Ortiz et *al.*, 2013). Des recherches récentes ont prouvé que le génome de l'actinobactérie *Streptomyces* possède beaucoup de gènes biosynthétiques responsables de la production de métabolites secondaires non exprimés (Baltz, 2019; Ikeda et *al.*, 2014). En effet, dans les conditions de laboratoire standard, les actinobactéries n'expriment qu'une très petite partie de gènes et les autres restent cryptiques (Rutledge and Challis, 2015). Par conséquent, les gènes cryptiques des actinobactéries doivent être considérés comme une source encore non exploitée de métabolites secondaires (Olano et *al.*, 2014).

En effet, plusieurs méthodes ont été introduites pour stimuler les gènes cryptiques des actinobactéries pour produire les métabolites secondaires (Scherlach and Hertweck, 2009). L'effet de la co-culture de l'*Actinobactérie* avec une autre bactérie sur la production de métabolite secondaire a été étudiée récemment par Yu et *al.*, (2019). Ainsi 5 molécules ont été isolées par co-culture de *Streptomyces rochei* MB037 avec *Rhinocladiella similis* 35. De même, Shin et *al.*, (2018) ont identifié une nouvelle molécule "Dentigerumycine E", détectable uniquement dans la co-culture de *Streptomyces* d'origine marine avec *Bacillus*. Une autre étude de co-culture impliquant des souches de *Streptomyces* a été menée par Sung et *al.*, (2017) et a démontré que la co-culture de *Streptomyces* avec d'autres bactéries pathogènes augmente la production de métabolites secondaires.

Au total, 33 nouveaux métabolites secondaires ont été isolés à partir de 12 actinobactéries par co-culture et sont décrits (Tableau 8).

Tableau 8. Métabolites secondaires isolés à partir des actinobactéries en co-culture avec d'autre bactérie

Produit	Producteur	Partenaire	Activité biologique	Références
Alchivemycins A–B	<i>Streptomyces endus</i> S522	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Antibactérien Inhibiteur de l'invasion des cellules tumorales	(Igarashi et al., 2010 ; Kim et al., 2013 ; Onaka et al., 2011)
Arcyriafavin E	<i>Streptomyces</i> <i>cinnamoneus</i> NBRC 13823	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Cytotoxique	(Hoshino et al., 2015c)
Chojalactones A–C	<i>Streptomyces</i> sp. CJ-5	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Cytotoxique	(Hoshino et al., 2015b)
Niizalactams A–C	<i>Streptomyces</i> sp. NZ-6	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Inconnu	(Hoshino et al., 2015a)
5a-THQs	<i>Streptomyces</i> <i>nigrescens</i> HEK616	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Antifongique	(Sugiyama et al., 2015)
Streptoaminals	<i>S. nigrescens</i> HEK616	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Antifongique Antibactérien	(Sugiyama et al., 2016)
Gordonic acid	<i>Streptomyces tendae</i> KMC006	<i>Gordonia</i> sp. KMC005	Antibactérien	(Park et al., 2017)
Ciromicin A	<i>Nocardiosis</i> sp. FU40 (Δ ApoS)	<i>Rhodococcus</i>	Cytotoxique	(Derewacz et al., 2015 ; Earl et al., 2018)
Ciromicin B		<i>wratislaviensis</i>		
Dracolactams A–B	<i>Micromonospora</i> <i>wenchangensis</i> HEK797	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Inconnu	(Hoshino et al., 2017)
Mirilactams C–E	<i>Actinosynnema mirum</i> NBRC 14064	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Inconnu	(Hoshino et al., 2018b)
Umezawamides A–B	<i>Umezawaea</i> sp. RD066910	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Cytotoxique	(Hoshino et al., 2018c)
Catenulobactins A–B	<i>Catenuloplanes</i> sp. RD067331	<i>T. pulmonis</i> TP- B0596	Cytotoxique	(Hoshino et al., 2018a)
Keyicin	<i>Micromonospora</i> sp. WMMB235	<i>Rhodococcus</i> sp. WMMA185	Antibactérien	(Adnani et al., 2017)

Toutes ces informations nous permettent d'affirmer que les gènes cryptiques responsables de la production de métabolites secondaires d'actinobactéries pourraient être activés dans des conditions spécifiques telles que la prédation. Quelques rares études se sont

intéressées à la prédation des actinobactéries par les seuls genres *Streptomyces* et *Agromyces ramosus* qui ont exprimé cette capacité (Casida, 1983; Kumbhar et al., 2014; Waksman and Woodruff, 1941).

La première actinobactérie prédatrice décrite dans la littérature est *Streptomyces* (Waksman and Woodruff, 1941). Kumbhar et al. (2014) ont montré par la suite que les *Streptomyces* sont des prédateurs épibiotiques facultatifs d'une variété de micro-organismes comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella* sp.. De plus, ils ont prouvé que les souches de *Streptomyces* qui ne présentaient pas d'activité prédatrice au début de l'expérience pouvaient le faire après plusieurs générations d'acclimatation.

Agromyces ramosus est une autre actinobactérie prédatrice facultative (Casida, 1983). Certaines souches sont capables d'attaquer et de détruire diverses bactéries à Gram négatif et à Gram positif, notamment *Azotobacter vinelandii*, *Rhizobium eguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* (Casida, 1983), ainsi que les levures. La destruction des cellules de la proie exige que le prédateur et la proie se trouvent à proximité immédiate (Chernyakovskaya et al., 2004).

Chapitre II

Isolement et screening des isolats d'actinobactéries prédateurs

1. Introduction

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses, Gram positif, caractérisées par un métabolisme secondaire bioactif très élevé. Ces bactéries ont l'aptitude de produire diverses molécules, biologiquement actives (antifongiques, antibiotiques...). Elles sont le premier producteur d'un grand nombre d'antibiotiques commercialisés (Abdelmohsen et *al.*, 2015; Arul Jose and Jebakumar, 2013).

L'isolement de nouvelles souches d'actinobactéries prédatrices productrices de nouveaux métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique, à partir de nouveaux habitats inexplorés pourrait être d'une grande utilité pour lutter contre les bactéries multirésistantes. En effet, le Maroc présente plusieurs niches écologiques non encore explorées et à notre connaissance, aucune étude scientifique approfondie sur les actinobactéries marines n'a été publiée à ce jour.

Le travail présenté dans ce premier chapitre détaille pour la première fois les techniques d'isolement de souches d'actinobactéries prédatrices, capables de croître en présence de cellules lavées de proie comme seule source de nutriments présente dans le milieu de culture, en combinant l'isolement et le criblage.

L'étude de l'activité prédatrice des isolats a été réalisée en trois étapes. La première étape est l'étude du spectre d'activité des isolats prédateurs sur plusieurs proies. La deuxième étape est la comparaison du spectre d'activité prédatrice des isolats prédateurs vis-à-vis de l'activité antibactérienne en milieu riche. La dernière étape consiste à l'étude de l'implication des substances diffusibles bactéricides dans le processus de prédation.

2. Matériel et Méthodes

2. 1. Echantillonnage

2. 1. 1. Techniques de prélèvement, de transport et de conservation

Le prélèvement des échantillons d'eau a été réalisé manuellement. Les échantillons sont prélevés dans des flacons stériles de 1 litre propres rincés plusieurs fois avec l'eau à analyser puis fermés hermétiquement sans laisser de bulles d'air dans les flacons. Les flacons sont transportés par la suite dans une glacière.

Les prélèvements d'échantillons d'eau ont été réalisés au niveau de neuf différents sites localisés sur la côte atlantique (Figure 11) :

- Eau de mer de Sidi Ifni (S1)
- Eau de mer d'Agadir (S2)
- Eau de mer de Cap Ghir (S3)
- Eau de mer d'Essaouira 1 (S4)
- Eau de mer d'Essaouira 2 (S5)
- Eau de mer de Badouza (S6)
- Eau de mer de l'Oualidia 1 (S7)
- Eau de mer de l'Oualidia 2 (S8)
- Eau de mer de Sidi Bouzid (S9)



Figure 11. Lieux d'échantillonnage des souches d'actinobactéries

2. 1. 2. Caractérisations chimiques des échantillons

Lors de l'échantillonnage la conductivité, la salinité et le pH des eaux ont été mesurés à l'aide d'un multi-paramètre portable HI98194.

2. 2. Isolement et screening des actinobactéries prédatrices

2. 2. 1. Bactéries (Proies)

➤ Bactéries sensibles :

Micrococcus luteus (ATCC381) ; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ;
Escherichia coli (ATCC 8739).

➤ Bactéries résistantes :

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) (NCTC 12493) ;

Escherichia coli (ATCC 35218).

2. 2. 2. Préparation de la proie

La proie *M. luteus* estensemencée sur gélose nutritive. Après 24 h d'incubation à 37 °C, une suspension est préparée dans l'eau physiologique stérile.

Des fioles d'erlenmeyer de 100 mL contenant 25 mL de bouillon nutritif sontensemencés par la préculture *M. luteus* à raison de (10^{12} UFC/mL) puis incubées pendant 24 h à 37 °C sous agitation. Ces cultures sont centrifugées stérilement à 4500 g pendant 10 min. Les surnageants sont écartés et les culots sont lavés trois fois par l'eau distillée stérile et repris dans 25 mL d'eau distillée stérile. Ces cellules lavées additionnées de l'agar-agar noble (14 g/L) représentent le milieu d'isolement et de criblage.

2. 2. 3. Isolement et screening des actinobactéries prédatrices

Nous avons développé des nouvelles techniques d'isolement des actinobactéries prédatrices. Pour chaque échantillon, la gamme de dilutions utilisée est comprise entre 10^0 à 10^{-6} . Trois méthodes d'ensemencement ont été suivies (nappe, en masse et en surface). Des témoins ont été réalisés parallèlement. Un millilitre de chaque dilution des échantillons d'eau de mer à tester estensemencé. Pour chaque ensemencement trois répétitions sont réalisées.

L'ensemencement en nappe consiste à déposer 1 mL de la dilution de l'échantillon de l'eau de mer au fond de la boîte avant l'ajout d'agar-agar en surfusion additionnée de 1 mL de la suspension de la proie lavée à la concentration 10^{12} UFC/mL.

La culture en masse consiste à couler 20 mL de la gélose en surfusion maintenue à 45 °C mélangé avec 1 mL de la proie lavée et 1 mL de la dilution à tester dans une boîte de pétri.

La culture en surface consiste à déposer 100 µL de la dilution de l'échantillon et 1 mL de la proie lavée à la surface du milieu agar-agar, puis à étaler à l'aide d'un râteau stérile.

➤ Témoins

Le premier milieu de validation de l'expérience est composé uniquement d'agar-agar, cette étape a pour but de vérifier que le milieu n'est pas contaminé et ne contient pas d'impureté.

Le deuxième milieu témoin est composé d'agar-agar et de la proie. Ce milieu est réalisé afin de vérifier que les cellules de bactérie proie sont vivantes et d'examiner leur abondance. Pour ce faire, la surface des boîtes est inondée par 1 mL de bouillon nutritif.

Le dernier témoin est composé uniquement des dilutions de l'échantillon ensemencé sur agar-agar, afin de valider que la croissance des microorganismes prédateurs est liée à la présence de la proie.

Les boîtes de témoins sont incubées pendant 24 h et les milieux d'isolement sont incubés pendant 21 jours à 28 °C.

2. 3. Purification des souches

L'ensemencement des souches a été effectué par la méthode de stries serrées en surface dans le milieu d'isolement constitué d'agar-agar additionné des cellules de proie lavée. L'incubation est faite à 28 °C pour une durée de 14 jours. Cette méthode est utilisée à la fois afin de vérifier que l'isolat est prédateur sans collaborateur et en même temps la purification des isolats.

Les colonies d'actinobactéries sont reprises sur le milieu Bennett pour obtenir des souches pures exemptes de toute contamination aussi bien bactérienne que fongique.

2. 4. Conservation des souches

2. 4. 1. Préparation du stock de spores

Les boîtes de Pétri, contenant le milieu Bennett, sont ensemencées à partir des isolats d'actinobactéries prédatrices purifiées. Après incubation pendant une à deux semaines à 30 °C jusqu'à sporulation maximale, 10 mL d'eau physiologique stérile sont déposés sur chaque boîte de Pétri. Les surfaces des boîtes sont grattées avec la pointe d'une pipette. Les suspensions sont

placées ensuite dans des tubes à essai stériles et agitées 1 min environ au vortex, puis sont filtrées sur du coton stérile placé dans des seringues stériles de 10 mL pour éliminer les morceaux d'agar. Les filtrats sont par la suite centrifugés 5 min à 5000 rpm.

2. 4. 2. Conservation par congélation dans le glycérol à -20 °C

Après centrifugation les spores des bactéries filamenteuses sont mises en suspension dans des Eppendorf contenant du glycérol 20 % stérile, puis congelés à -20 °C (Rivière, 1975).

2. 4. 3. Conservation dans le sable

Après stérilisation des tubes à vis contenant du sable et du carbonate de calcium (2 %) pendant trois fois 30 min à 120 °C, les spores d'actinomycètes sont ajoutées. La conservation des tubes se fait à la température ambiante (Rivière, 1975).

2. 5. Spectre de l'activité de prédation des isolats sélectionnés vis-à-vis différentes proies

Le spectre d'activité des isolats prédateurs purifiés et sélectionnés est testé en utilisant des cellules lavées de différentes proies : *M. luteus* (ATCC381), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 8739), SARM (NCTC 12493) et *E. coli* résistante (ATCC 35218).

Les proies sont étalées séparément sur des boîtes contenant l'agar-agar et l'isolat prédateur est inoculé au centre (Figure 12).

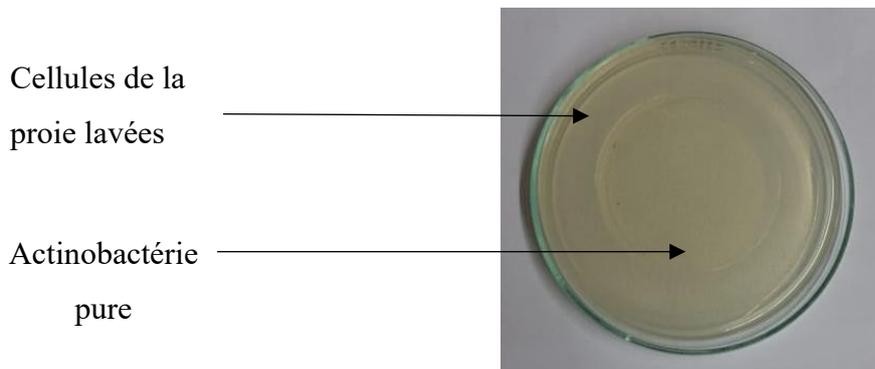


Figure 12. Etude du spectre de l'activité de prédation

2. 6. Activité antibactérienne des isolats sélectionnés par la méthode conventionnelle sur milieu Bennett

2. 6. 1. Préparation des inoculas de bactérie test

Un inoculum est réalisé sur gélose nutritive à partir d'une culture bactérienne de 24 heures des souches testées *M. luteus* (ATCC381), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 8739), SARM (NCTC 12493) et *E. coli* résistante (ATCC 35218). La densité cellulaire de cet

inoculum a été ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile et ajusté à 0,5 Mc Ferland, ce qui correspond à une concentration finale de 10^6 UFC/mL.

2. 6. 2. *Activité antibactérienne sur milieu Bennett*

Cette technique consiste à ensemencer les isolats d'actinobactéries en stries serrées sur le milieu de production Bennett. Après incubation des cultures à 27 °C pendant une à deux semaines, trois cylindres de gélose de chaque culture (6 mm de diamètre) sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce et déposés soit sur le milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par les inoculas de bactérie test (Figure 13). Un témoin négatif avec un cylindre de milieu de production sans culture d'actinomycète est mis dans chaque boîte de Pétri.

Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 4 °C pendant quatre heures pour permettre une diffusion des substances actives, puis elles sont incubées à la température de 37 °C pendant 24 h.

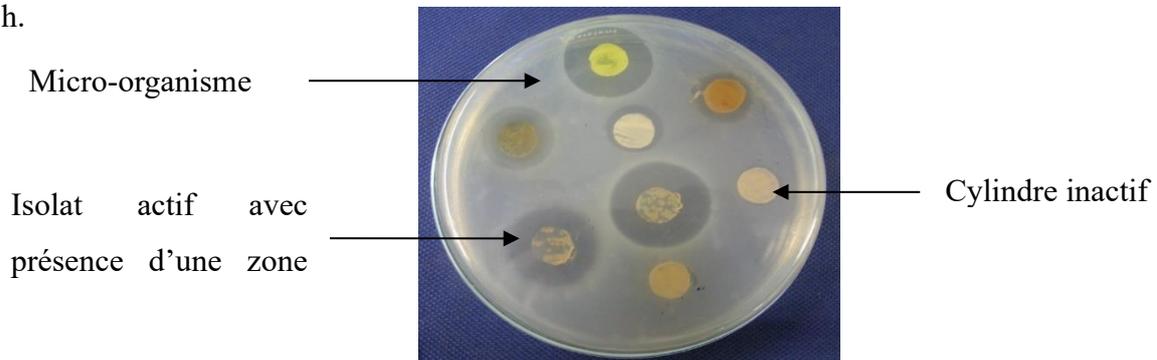


Figure 13. Mise en évidence de l'activité antibactérienne en milieu solide par le test des cylindres d'agar

2. 7. Analyses Statistiques

Les diamètres d'inhibitions obtenus à partir de l'activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries sur le milieu Bennett ont été analysés à l'aide de l'analyse de variance (ANOVA, $p < 0,05$). Le test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$) a été utilisé pour analyser les différences significatives entre les isolats d'actinobactéries testées. Le logiciel utilisé est XLSTAT (Version 2016.02.27444).

2. 8. Diffusion des antibactériens impliqués dans la prédation

L'implication de substances diffusibles dans l'activité de prédation a été étudiée. Un volume de 0,1 mL des cellules de la proie lavée est étalé à la surface du milieu agar-agar, les cellules d'actinobactéries potentiellement prédatrices sont inoculées au centre et incubées à 28 °C (Figure 14).

Pour évaluer l'état ou la vitalité des cellules proies, un ensemble de points situés à différentes distances de la zone claire autour du prédateur sont repiqués sur la gélose nutritive, la même procédure est effectuée après 48 h d'incubation.

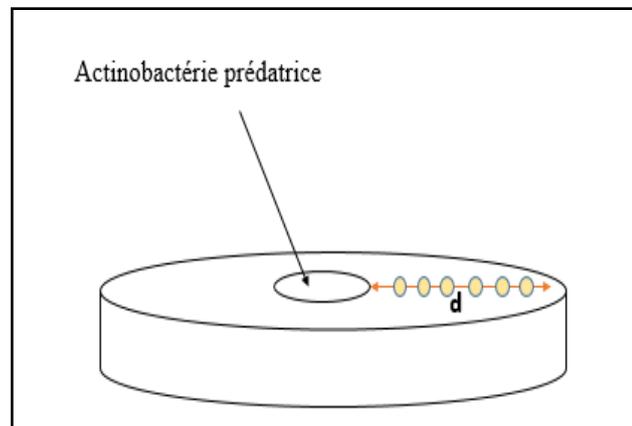


Figure 14. Technique d'étude de la diffusion de l'antibiotique impliqué dans le processus de prédation

2. 9. Confirmation de l'implication des antibactériens dans la prédation

2. 9. 1. Préparation des inoculas

Un inoculum est réalisé à partir d'une culture bactérienne de 24 heures de la proie lavée et une culture de l'actinobactérie lavée de 15 jours. L'inoculum est préparé de la manière suivante : 9 mL de l'actinobactérie avec une concentration de 10^{12} UFC/mL + 9 mL de la proie lavée avec une concentration de 10^{12} UFC/mL. Par la suite, un litre de milieu en surfusion composé d'agar-agar est maintenu à 45 °C est mélangé avec l'inoculum préparé pour une utilisation ultérieure.

2. 9. 2. Culture en milieu solide

Dans l'objectif d'éviter le contact des cellules bactériennes avec les disques de papiers, deux boîtes de Pétri en verre sont utilisées : une grande boîte de Pétri (9 cm) et une petite boîte de Pétri (5 cm). Cette dernière est introduite d'une façon inversée au sein de la grande boîte. Ensuite, 15 mL de milieu composé d'agar-agar est coulé dans la zone délimitée par la petite boîte. Après la solidification de l'agar-agar, la petite boîte de Pétri est enlevée et le vide est rempli par 5 mL de l'inoculum déjà préparé. Le milieu est incubé pendant 15 jours à 28 °C. Par la suite, après l'apparition des cellules du prédateur, les disques de papiers stériles 6 mm de diamètre sont placés sur la surface de l'agar-agar dans la zone hors de croissance de l'actinobactérie prédatrice pendant 24 h. Parallèlement, afin d'étudier l'effet du milieu de culture, un disque de papier stérile a été déposé à la surface de milieu agar-agar seul, qui a servi comme témoin. L'ensemble de ces étapes sont schématisées au niveau de la Figure 15.

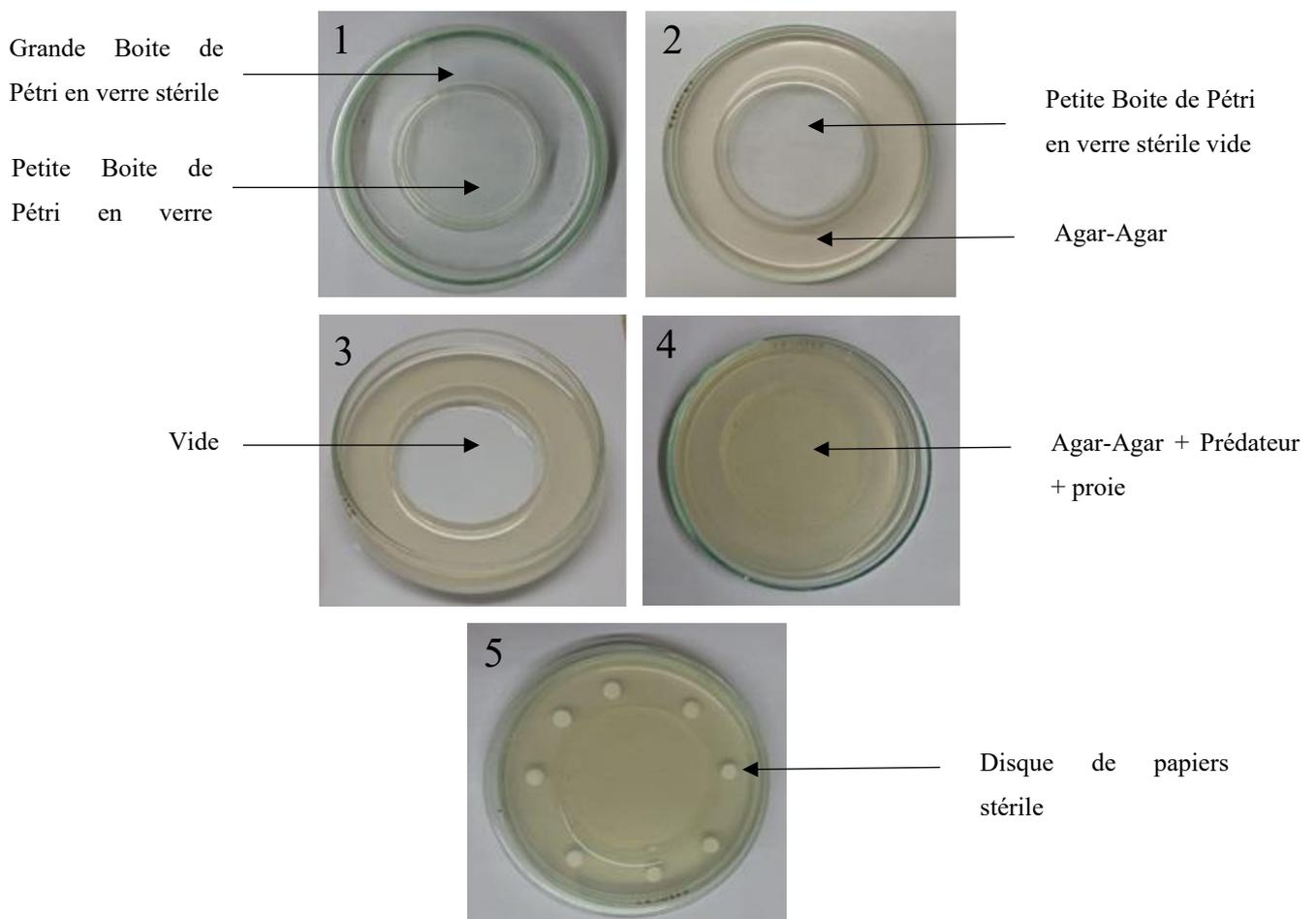


Figure 15. Principe de la méthode d'adsorption des molécules actives

2. 9. 3. Préparation des inoculas de bactérie test

Un inoculum est réalisé sur gélose nutritive à partir d'une culture bactérienne de 24 heures. La densité cellulaire de cet inoculum est ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile et comparée avec la solution Mc Ferland, ce qui correspond à une concentration finale de 10^6 UFC/mL.

2. 9. 4. Activité antibactérienne

Le milieu Mueller-Hinton est distribué dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre (15 mL). Ensuite, les disques imbibés de substances par capillarité sont prélevés à l'aide d'une pince stérile et sont déposés à la surface du milieu Muller-Hinton préalablementensemencé par l'inoculum de la bactérie test (Figure 16). La même procédure est réalisée pour le disque de papier témoin qui a été déposé sur milieu agar-agar seul. Deux autres témoins sont ajoutés : un disque de papier stérile non traité, pour valider que l'activité antibactérienne n'est pas due au disque de papier et un disque d'antibiotique commercial (Céfoxitine (Fox) pour valider la résistance de la souche test *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline).

Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 4 °C pendant quatre heures pour permettre une diffusion des substances actives, puis elles sont incubées à la température de 37 °C pendant 24 heures.

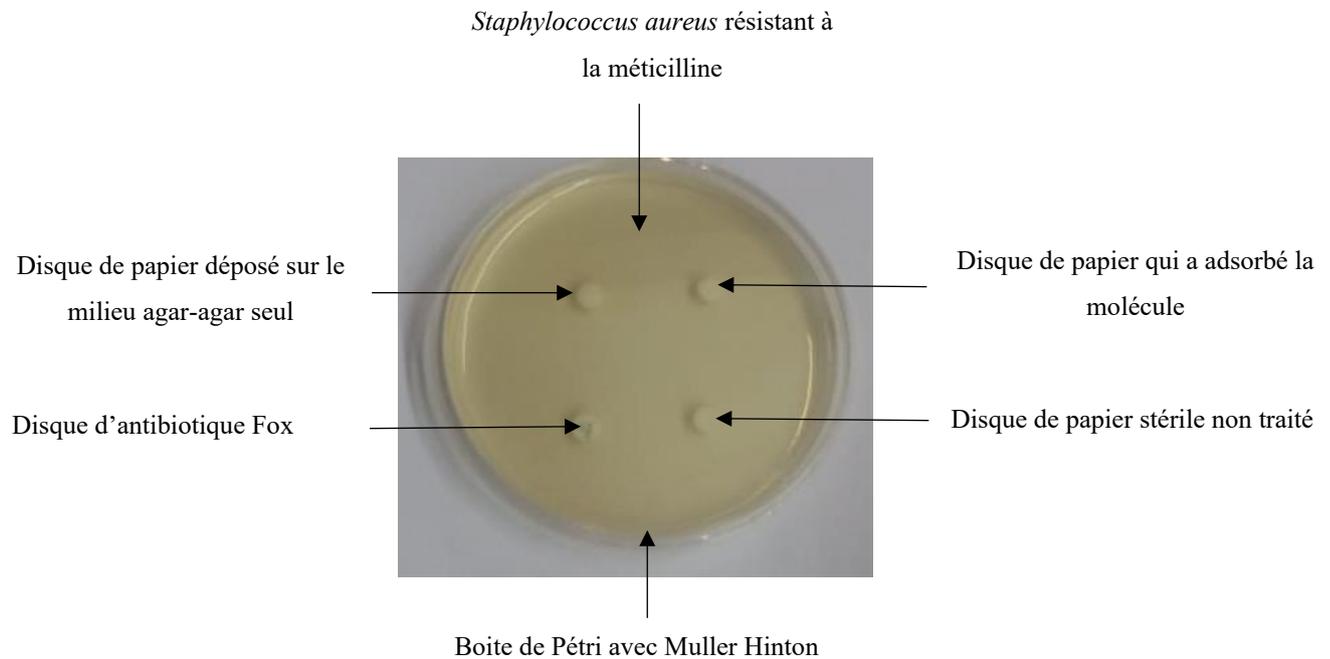


Figure 16. Vérification de la méthode d'adsorption des molécules actives par les disques de papiers

3. Résultats et discussions

3. 1. Caractéristiques physicochimiques des échantillons

Les investigations sont effectuées sur 9 échantillons d'eaux de mers collectés à partir de plusieurs stations situées sur la côte atlantique marocaine (Sidi Ifni, Agadir, Cap Ghir, Essaouira, Badouza, Oualidia et Sidi Bouzid). La stratégie d'échantillonnage réside dans la diversité des stations où ont été effectués les prélèvements afin d'améliorer le nombre d'actinobactéries prédatrices potentielles. Les 9 échantillons d'eaux de mers analysés ont présenté une salinité proche (Tableau 9). Les valeurs obtenues ont été proches de celles reportées par Khattabi (2005). La conductivité de nos échantillons varie entre 53,3 à 54,4 mS/cm sachant que la conductivité de l'eau de mer selon les données bibliographiques a été environ de 50 mS/cm. De plus, une salinité considérable de 35,1 mg/L et 35,8 mg/L a également été constatée et les 9 échantillons des eaux de mers analysées avaient une salinité

proche. Finalement, les valeurs de pH des eaux de mers sont comprises entre 7,5 et 8,26 (Chafik et al., 2001; Maanan, 2008), ce qui est le cas du pH de nos échantillons.

Tableau 9. Paramètres physico-chimiques des échantillons analysés

Echantillons	Localisation	Conductivité (mS/cm)	Salinité (g/L)	pH
1	Agadir	53.9	35.6	7.76
2	Cap Ghir	54	35.6	7.84
3	Essaouira 1	54.2	35.8	7.84
4	Essaouira 2	53.4	35.1	7.99
5	Badouza	54.2	35.8	7.92
6	Oualidia 1	54.1	35.6	7.96
7	Oualidia 2	54.1	35.7	8.08
8	Sidi Bouzid	54.2	35.6	8
9	Sidi Ifni	54	35.6	7.76

3. 2. Isolement et screening des actinobactéries prédatrices

Dans la présente étude, nous présentons la première investigation menée pour confirmer que l'environnement oligotrophe, comme l'eau de mer, peut être une source prometteuse d'actinobactéries prédatrices. De plus, leur isolement de l'habitat marin n'a pas encore été décrit. Ceci pourrait être lié au fait que les actinobactéries étaient traditionnellement considérés comme des compétiteurs plutôt que des prédateurs.

Au total, une dizaine d'isolats prédateurs présentant des aspects morphologiques bactériens ont été isolés à partir de 9 échantillons des eaux de mers (Tableau 10). Après 14 à 21 jours d'incubation à 28 °C, les bactéries prédatrices apparaissent sur le milieu d'isolement contenant l'agar-agar et les cellules lavées de la proie bactérienne à Gram positif *M. luteus* comme seule source de nutriments (Figure 17). L'apparition d'unités formant colonies (UFC) indique la présence d'au moins un prédateur. Pour avoir des cultures pures, les (UFC) ont été repiquées sur le même milieu d'isolement. Par la suite, les bactéries pures de morphologie filamenteuse caractéristiques des actinobactéries ont été reconnues par observations microscopique des boîtes avec l'objectif 10 et selon les directives de Projet International sur les *Streptomyces* (ISP). Du point de vue cinétique, l'apparition des filaments d'actinobactéries prédatrice de *M. luteus* commence après 72 à 96 h. Après purification, les isolats ont été

conservés sur le milieu Bennett en pente. Les résultats de l'isolement des actinobactéries sont présentés dans le Tableau 10.

Au total, 142 isolats bactériens ont été isolés à partir de 9 stations, 4 isolats d'actinobactéries se sont avérés capables de croître en présence des cellules lavées de la proie bactérienne *M. luteus* comme seule source de nutriments présente dans le milieu de culture après 72 à 96 h d'incubation. Ceci suggère que les actinobactéries prédatrices sont des membres actifs dans l'environnement marin.

Il est intéressant de noter que certaines actinobactéries, le genre *Streptomyces*, sont connues par le phénomène de « Mort Cellulaire Programmée » (Programmed Cell death/PCD) (Beites et al., 2015; Tenconi et al., 2018; Yagüe et al., 2010). En effet, ce mode de suicide cellulaire s'active en réponse à des stress abiotiques et biotiques tels que l'épuisement des nutriments (Manteca et al., 2006). Par la suite, une partie du mycélium de substrat est sacrifiée, ce qui va conduire à la libération de nutriments dans le milieu, qui seront utilisés pour la formation des hyphes et des spores aériennes (Van der Meij et al., 2017). En revanche, en prédation, les actinobactéries n'ont pas manifesté une croissance dans le Témoin composé par l'agar-agar seul ce qui annule l'hypothèse de l'implication du phénomène de la Mort Cellulaire Programmée par nos isolats prédateurs.

Dans la littérature, diverses bactéries sont réputées pour croître par lyse d'une variété de micro-organismes proies (Casida Jr, 1982; Sangkhobol and Skerman, 1981; Singh, 1947; Stolp and Petzold, 1962). Les bactéries prédatrices se retrouvent dans une grande variété d'habitats dont l'eau de mer (Jurkevitch, 2007; McBride and Zusman, 1996).

Les résultats de la présente étude sont intéressants et encourageants car ils montrent que les actinobactéries prédatrices peuvent facilement être isolées par une méthodologie simple et les équipements d'un laboratoire de microbiologie classique. La mise en évidence directe est basée sur la définition standard de l'interaction de prédation et un savoir-faire dans compilation des exigences trophiques des microorganismes.

Les résultats de notre expérience montrent que la meilleure méthode est celle où la proie est cultivée en masse avec de l'agar-agar et inondée d'eau de mer. En effet, un grand nombre de bactéries prédatrices ont été isolées par cette technique. L'absence de croissance des souches isolées sur agar-agar et leur croissance sur agar-agar en présence de *M. luteus* confirment la prédation (Figure 17).

Tableau 10. Origine des isolats d'actinobactéries sélectionnés

Echantillons	Nombre de bactéries prédatrices	Nombre d'actinobactéries prédatrices	Méthode d'isolement	Code
1	23	2	Masse Nappe	EMM111 EMM112
2	12	1	Nappe	EMM115
3	17	1	Nappe	EMM116
4	6	1	Nappe	EMM117
5	11	0	-	-
6	5	1	Nappe	EMM118
7	18	1	Nappe	EMM119
8	30	1	Masse	EMM183
9	20	1	Masse	EMM194

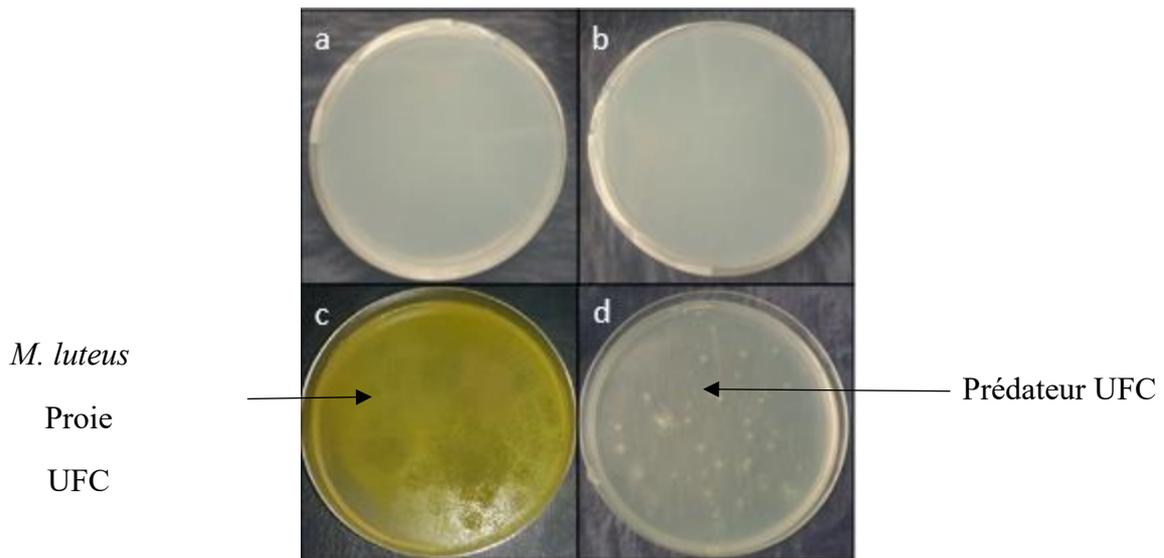


Figure 17. Etapes d'isolement des actinobactéries prédatrices. **(a)** Absence de croissance de *M. luteus* sur agar- agar **(b)** Absence de croissance sur agar-agar inoculé par l'échantillon **(c)** Croissance de *M. luteus* sur agar-agar **(a)** Inondé par le bouillon nutritif. **(d)** Croissance des potentiels prédateurs capables d'utiliser *M. luteus* comme proie

3. 3. Spectre d'activité de prédation des isolats sélectionnés vis-à-vis différentes proies et activité antibactérienne sur milieu de production riche (Bennett)

Le spectre d'activité de prédation des quatre isolats sélectionnés ainsi que l'activité antibactérienne sur milieu riche Bennett ont été testés sur 5 bactéries : *M. luteus* (ATCC381), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 8739), SARM (NCTC 12493) et *E. coli* résistante (ATCC 35218). En ce qui concerne l'activité de prédation, les 4 isolats ont montré une aptitude à croître sur les 5 proies candidates après 7 jours d'incubation. Les souches multirésistantes sont sensibles à la prédation (Tableau 11). Contrairement à l'activité antibactérienne sur milieu riche qui a montré que les 4 isolats ont un effet significatif sur au moins une des bactéries-tests (Figures 18 et 19, Tableau 11), l'isolat EMM112 présente la meilleure activité antibactérienne sur milieu Bennett contre les bactéries Gram-positif et Gram- négative. Le maximum de la zone d'inhibition de l'isolat EMM112 a été enregistré contre *M. luteus*. De plus, EMM111 a un effet significatif contre les bactéries à Gram positif *S. aureus*, SARM et *M. luteus*, EMM183 a par ailleurs montré une activité antagoniste significative contre SA et SARM. Cependant, EEM194 a montré une seule activité antibactérienne significative contre *E. coli*. L'isolat le plus prometteur du fait de l'activité antibactérienne sur milieu Bennett contre le SARM est l'isolat EMM112.

L'étude du spectre de l'activité de prédation a été adoptée pour mieux évaluer la capacité de prédation des isolats vis-à-vis les bactéries Gram positive et négative étudiées. En effet, du point de vue production des antimicrobiens, le pourcentage de souches d'actinobactéries actives *vis-à-vis* des bactéries Gram positive est largement supérieur à celui des souches actives *vis-à-vis* des bactéries à Gram négatif (Anibou, 2008; Ouchari, 2019). Parmi les hypothèses plausibles, les bactéries à Gram négatif possèdent les lipo-polysaccharides qui bloquent certains antibiotiques (Cwala et *al.*, 2011; Ouchari, 2019). En revanche par prédation, il est clair d'après nos résultats que la structure de la paroi cellulaire de la proie n'est pas un facteur dominant dans la sensibilité de la proie aux actinobactéries prédatrices. Un résultat similaire a été rapporté pour d'autres bactéries prédatrices (Banning, 2010). Il est probable que les deux activités ont des rôles écologiques spécifiques et des métabolites différents sécrétés par le microorganisme prédateur. En effet, il est connu que la production des antibiotiques varie en fonction de la composition du milieu de culture (Hoshino et *al.*, 2019; Pettit, 2009; Ueda and Beppu, 2017). Cette méthodologie, appelée l'approche "OSMAC" «Une souche de nombreux composés» (One Strain-Many Compounds), permet d'améliorer la production des composés bioactifs par la même souche de microorganisme en faisant varier les conditions de culture (Bode et *al.*, 2002). Les actinobactéries sont également connues pour leur capacité à produire de différents composés bioactifs via l'application de cette approche qui consiste à tester différentes conditions de croissance (composition du milieu, température, salinité, oxygénation, pH, co-culture, changement du régime alimentaire, ...) sur une même souche (Rateb et *al.*, 2018; Romano et *al.*, 2018; Saleem et *al.*, 2009). De ce fait, l'utilisation des constituants cellulaires d'une proie comme nutriment constitue un régime alimentaire particulier qui fait partie de la stratégie OSMAC.

Les quatre actinobactéries isolées se sont également avérées des prédateurs facultatifs, elles sont capables de se développer en l'absence de proies sur une variété de milieux riches, ce qui explique le faible nombre d'actinobactéries prédatrices découvertes jusqu'à présent comparativement aux autres bactéries antagonistes. Ce résultat prouve que l'approche classique utilisée pour l'isolement des actinobactéries ne permet pas de détecter l'activité prédatrice.

L'observation microscopique (Figure 20) suggère que la stratégie utilisée par les actinobactéries prédatrices pour attaquer leurs proies est la chasse collective ou appelée aussi Wolfpack. Dans ce type de prédation, les prédateurs agissent en groupe et sécrètent en commun une variété de composés diffusibles comme les enzymes hydrolytiques et les antibiotiques extracellulaires qui dégradent et tuent les bactéries voisines (Korp et *al.*, 2016). La stratégie de

Wolfpack consiste à lyser les cellules proies de l'extérieur par des molécules très concertées (Martin, 2002). En outre, l'augmentation de la densité des cellules prédatrices suggère l'augmentation de sécrétion des composés diffusibles (Keane et Berleman, 2016).

Dans notre étude, nous ne pouvons pas visualiser clairement la stratégie de Wolfpack puisque le prédateur et la proie sont proches l'un de l'autre, la prédation par mécanisme épibiotique reste la plus probable. Un objectif grossissant 100x aiderait à bien visualiser s'il s'agit d'un wolfpack. De plus, l'imagerie au Microscopie électronique à balayage (SEM) ou Microscopie Electronique à Transmission (TEM) est nécessaire pour voir si la prédation dans notre cas exige le contact entre le prédateur et la proie.

Tableau 11. L'activité de prédation et antibactérienne des isolats sélectionnés vis-à-vis des différentes bactéries

Bactérie	Activité de prédation					Activité antibactérienne sur Bennett				
	<i>M. luteus</i> ATCC 381	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 8739	SARM NCTC 12493	<i>E. coli</i> résistante ATCC 35218	<i>M. luteus</i> ATCC 381	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 8739	SARM NCTC 12493	<i>E. coli</i> résistante ATCC 35218
Prédateur										
EMM111	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
EMM112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EMM183	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
EMM194	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-

+ = Présence d'activité / - = Absence d'activité

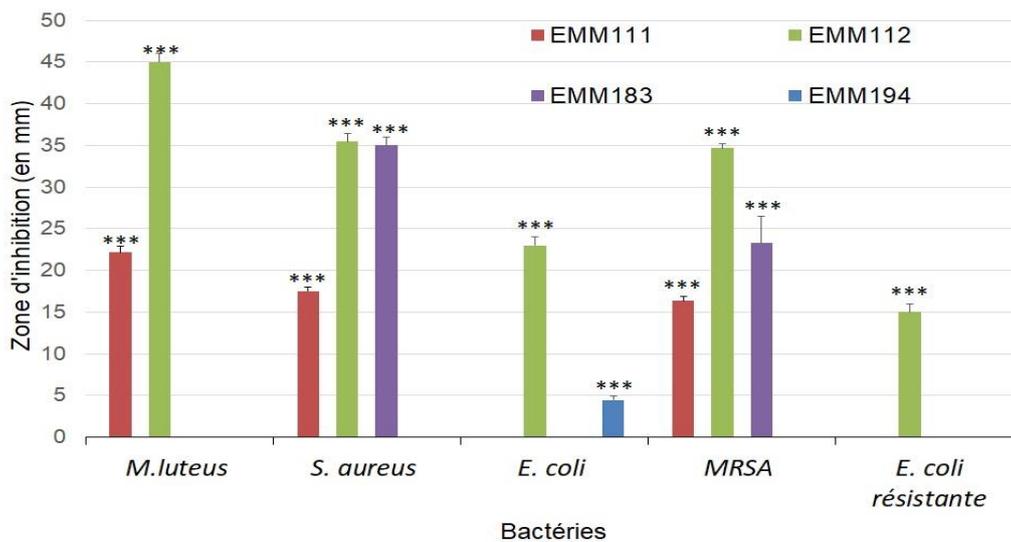


Figure 18. Action antibactérienne des 4 isolats d’actinobactéries vis-à-vis des 4 bactéries sur milieu Bennett. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type de trois répétitions

***P < 0,001 indique les différences significatives par rapport au témoin cylindre d’agar du milieu de Bennett

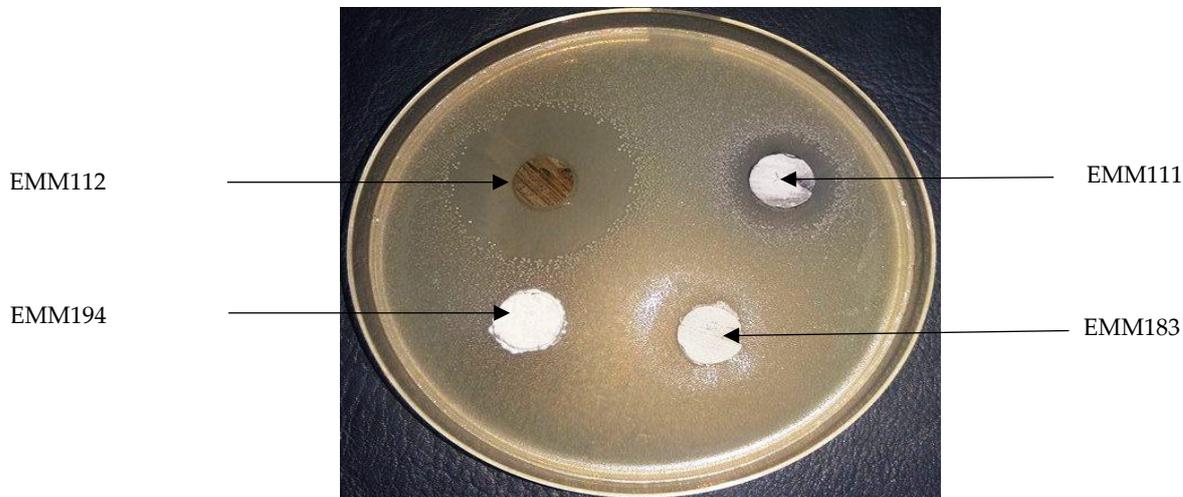


Figure 19. Mise en évidence de l’activité antibactérienne contre la souche *S. aureus* résistante à la Mécicilline (SARM)

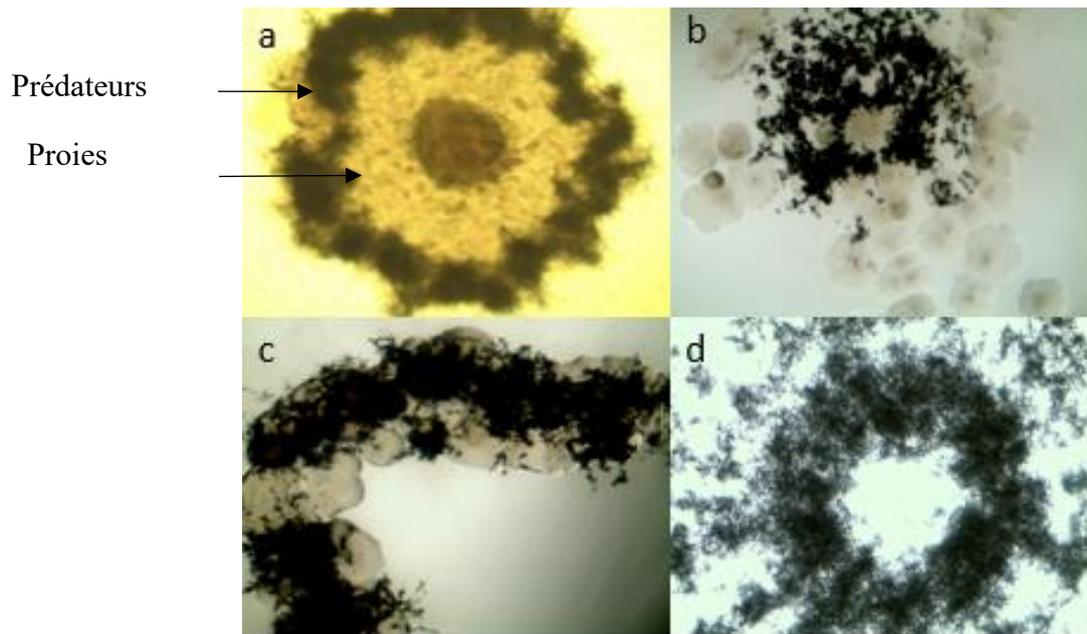


Figure 20. Stratégie de prédation utilisée par l'isolat EMM111 contre *M. luteus*. **(a)** Reconnaissance de la proie. **(b)** et **(c)** Actinobactérie prédatrice chassant la proie en Wolfpack **(d)** Elimination totale de la proie après 15 jours (Grossissement $\times 400$)

3. 4. Diffusion et confirmation de l'implication des antibactériens dans la prédation

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le Tableau 12 et la Figure 21. Après 24 h, les boîtesensemencées à partir de l'extrémité du dépôt du prédateur montrent que l'abondance des colonies de la proie augmente en s'éloignant du centre de la boîte Pétri où il y a l'isolat prédateur (Figure 21.b). En ce qui concerne les boîtesensemencées après 48 h d'incubation, la charge non seulement décroît en allant du centre de la boîte vers l'extrémité mais il y a une zone claire autour de la colonie du prédateur visible à l'œil nu (Figure 21.c). De plus, les zones (1 et 2) qui sont près du prédateur n'ont pas manifesté une croissance après 48 h. Ces résultats montrent que le prédateur a tué la proie. Ce qui suggère l'implication des substances diffusibles par les isolats prédateurs dans l'activité prédatrice.

Les disques imbibés de substances par capillarité (Figure 22) ont montré qu'il y a une activité antibactérienne, ce qui prouve que les disques sont imbibés de substances bioactives. Les disques témoins (disque de papier déposé sur le milieu seul et disque de papier stérile non traité) n'ont aucun effet sur la bactérie test, ce qui montre que l'activité antibactérienne est liée aux substances imbibées par capillarité durant la prédation.

Dans des travaux similaires et comparatifs (Berleman and Kirby, 2009; Kumbhar et al., 2014; Muñoz-Dorado et al., 2016; Reichenbach and Höfle, 1993), ont confirmé l'implication des enzymes lytiques et de petites molécules bioactives par les bactéries prédatrices notamment par le genre *Streptomyces*.

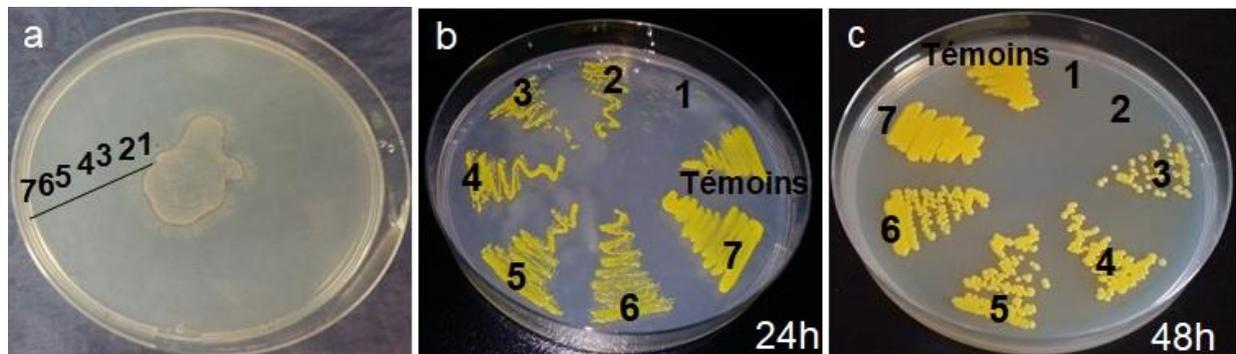


Figure 21. Implication des substances diffusibles au cours de la prédation

(a) Croissance de l'actinobactérie prédatrice en présence des cellules de la proie lavée *Micrococcus luteus* comme seule source de nutriment dans le milieu. (b) Abondance de la proie après 24 h. (c) Abondance de la proie après 48 h

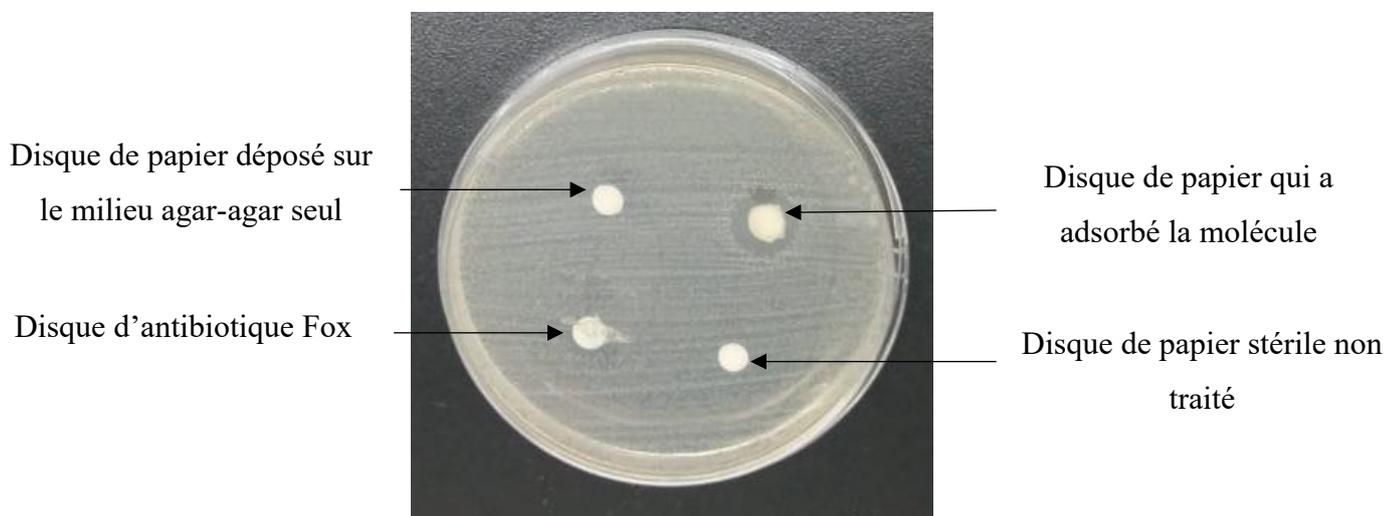


Figure 22. Activité antibactérienne de l'isolat EMM111 contre la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline

Tableau 12. Croissance de la proie en fonction de la distance du prédateur

Proie	Prédateur	24 h							48 h						
		d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
<i>M. luteus</i> (ATCC381)	EMM111	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
	EMM112	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM183	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM194	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	EMM111	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
	EMM112	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM183	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM194	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	EMM111	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
	EMM112	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM183	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM194	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
SARM (NCTC 12493)	EMM111	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
	EMM112	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM183	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM194	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> résistante (ATCC 35218)	EMM111	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
	EMM112	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM183	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	EMM194	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++

(++ +) : Abondant, (++) : Moyennement abondant. (+) : Faible et (-) : Absence

4. Conclusion

Dans le but de mettre en évidence la présence des actinobactéries prédatrices dans l'eau de mer et de sélectionner des isolats à activité de prédation vis-à-vis les bactéries pharmaco-résistantes, 142 bactéries prédatrices ont été isolées à partir de différents habitats marins marocains. Parmi celles-ci, 4 actinobactéries se sont avérées capables de croître en présence de cellules lavées de *M. luteus* comme seule source de nutriments. L'isolement et la purification des souches ont été réalisés sur des milieux spécifiques pour les actinobactéries prédatrices.

Au cours de ce chapitre, le spectre de l'activité de prédation et l'activité antibactérienne sur milieu riche Bennett des 4 isolats prédateurs a été testé. Les 4 isolats ont manifesté une activité de prédation *vis-à-vis* des 5 souches testées y compris les bactéries multirésistantes. L'activité antibactérienne a montré que les 4 isolats sont actifs sur au moins une des bactéries-tests. Par conséquent, il est probable que les deux activités ont des rôles écologiques spécifiques et sont liées à des métabolites différents sécrétés par le microorganisme prédateur.

De même, nous avons remarqué que la croissance des 4 isolats prédateurs sélectionnés est concomitante à la diffusion de la ou des substances bactéricides. Ces prédateurs sont impliqués dans la mort des proies testées. L'identification de quatre isolats d'actinobactéries est très importante pour la suite de notre étude. Elle fera l'objet du chapitre suivant.

Chapitre III

Caractérisation taxonomique des isolats prédateurs sélectionnés

1. Introduction

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses à Gram positif dont la teneur d'ADN en Guanosine et Cytosine (G+C) est très élevée (72-75 %) (Ait Barka et *al.*, 2016; Heuer et *al.*, 1997). Pendant longtemps, leur classification a été fondée sur des critères morphologiques et chimiques. Cependant, avec la prolifération des espèces, il a été constaté que ces méthodes sont insuffisantes et peu décisives pour différencier les organismes proches ou pour la détermination d'un groupement rationnel des genres au sein du groupe (Loqman, 2009).

Plus récemment, la classification morphologique et chimique des actinobactéries a été renforcée par la taxonomie moléculaire, obtenue grâce aux progrès rapides du séquençage du génome (Aitbarka et *al.*, 2016). Cette nouvelle approche appelée polyphasique a permis de classer certains organismes qui n'ont pas été placés de façon appropriée dans certains groupes taxonomiques (Zhi et *al.*, 2009). Actuellement, une nouvelle espèce ne peut être revendiquée sans une analyse génétique basée sur l'amplification du gène de séquences l'ARNr 16S par PCR.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est l'identification des isolats d'actinobactéries prédateurs sélectionnés par des techniques physiologiques et moléculaires. Il est aussi important de signaler que cette étape d'identification va nous permettre d'une part de retirer les souches pathogènes et d'autre part d'avoir une idée sur l'originalité des isolats et sur les molécules impliquées dans l'activité de prédation observée. Autrement dit, les souches sélectionnées sont-elles de nouvelles espèces d'actinobactéries ou des espèces connues prédatrices ?

La classification des souches a été réalisée en deux étapes. L'étape numérique porte sur les caractéristiques morphologiques, culturelles et physiologiques des actinobactéries prédatrices. La deuxième étape est basée sur leurs caractéristiques moléculaires.

2. Matériel et méthodes

2. 1. Préparation des inocula d'actinobactéries

2. 1. 1. *Inoculum général*

Les isolats d'actinobactéries pures sont ensemencés sur le milieu Bennett gélosé. Après 7 jours d'incubation à 28 °C, une suspension dense de fragments mycéliens et de spores est préparée en eau physiologique stérile. Cet inoculum sert à l'ensemencement des différents milieux de culture sauf le milieu ISP9 (ISP= International *Streptomyces* Project).

2. 1. 2. *Inoculum lavé*

Des erlenmeyers de 100 mL contenant 25 mL de milieu Bennett liquide sont ensemencées par 1 % d'inoculum général, puis elles sont incubées pendant 48 h à 28 °C sous agitation. Ces cultures sont centrifugées stérilement à 4500 g pendant 10 min. Les surnageants sont écartés et les culots sont lavés trois fois par l'eau distillée stérile et repris dans 25 mL d'eau distillée stérile. Ces suspensions sont ensemencées dans le milieu ISP9 qui permettra d'étudier l'utilisation des différents substrats carbonés par les isolats.

2. 2. Micromorphologie

2. 2. 1. *Culture sur lamelle*

Une lamelle stérile est insérée soigneusement dans le milieu Bennett solide de façon à former un angle de 45 °C avec celui-ci (Figure 23), une goutte d'une suspension d'actinobactérie est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu nutritif (Williams and Cross, 1971).

Après une semaine d'incubation à 28 °C, la lamelle est retirée délicatement du milieu gélosé en entraînant le mycélium aérien. Elle est déposée sur une lame et examinée au microscope optique et au microscope électronique à balayage (MEB) à différents grossissements. Les observations sont réalisées pour étudier la pigmentation des mycéliums aériens, des spores (position, ajustement et forme des spores) et des mycéliums de substrats.

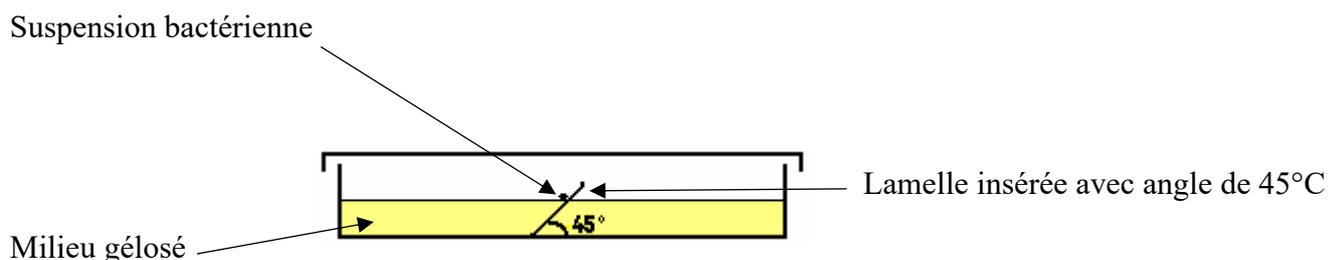


Figure 23. Schéma présentant la culture sur lamelle (Ouchari, 2019)

2. 2. 2. Culture sur lame

Dans une boîte de Pétri, une lame stérile est déposée sur un support de vert. Par la suite, 2 mL de milieu Bennett gélosé en surfusion (45 °C) est coulé sur la lame. Après la solidification du milieu de culture, deux à cinq gouttes du même milieu sont coulées sur la lame pour former deux rails surélevés, disposés dans le sens de la largeur de la lame. Une goutte de la suspension d'actinobactérie est placée entre les deux rails de sorte que l'inoculum entre en contact avec elle (Figure 24).

Finalement, 4 mL d'eau stérile sont déposés au fond de la boîte de Pétri pour empêcher le dessèchement rapide du milieu de culture. Après 14 jours d'incubation à 28 °C, les spores et les mycéliums aériens sont observés par microscope optique (Ouhdouch, 1996).

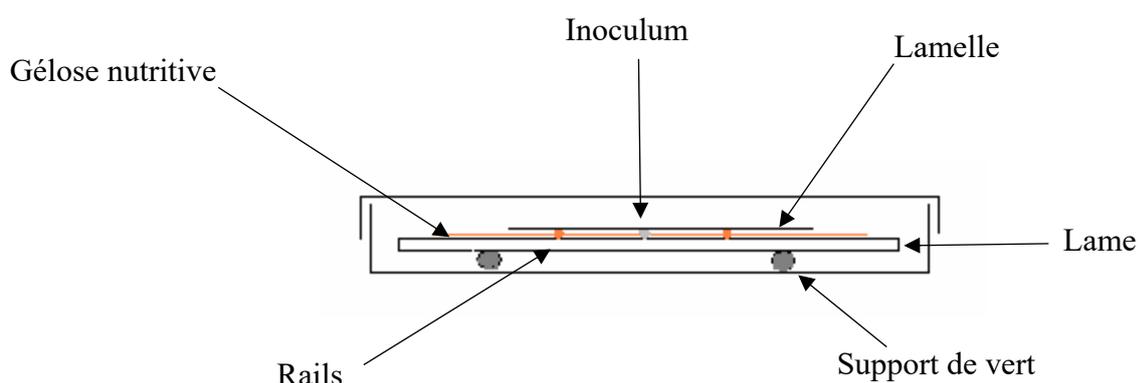


Figure 24. Schéma présentant la culture sur lame (Anibou, 2008)

2. 3. Etude des caractéristiques culturelles des isolats d'actinobactéries sur milieux ISP

Les caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats d'actinobactéries prédateurs sont étudiées par l'ensemencement de ces dernières dans les différents milieux de culture : extrait de levure-tryptone-agar (ISP1), extrait de levure-tryptone-agar (ISP2), farine d'avoine-agar (ISP3), sels inorganique-amidon-agar (ISP4) et glycérol-asparagine-agar (ISP5) (Shirling and Gottlieb, 1966). Après 14 jours d'incubation en boîtes à 28 °C, plusieurs caractéristiques sont observées à savoir : la couleur du mycélium aérien et du substrat, la présence ou l'absence de sporulation, la production des pigments.

2. 4. Utilisation des glucides

L'inoculum lavé des isolats d'actinobactéries est ensemencé par stries sur milieu ISP9 avec trois répétitions pour chaque glucides (Shirling and Gottlieb, 1966). Des solutions de ces sources de carbone (saccharose, galactose, lactose, mannose, mannitol, sorbitol, arabinose, fructose, dextrine et maltose) sont stérilisées par filtration sur membrane Millipore (0,45 µm). Les solutions sont ensuite, ajoutées au milieu de base ISP9.

La lecture des résultats est réalisée après 14 jours et comparée aux témoins positifs en présence de 1 % de glucose et négatif sans source de carbone.

2. 5. Production de pigments mélanoides

La mise en évidence de la production des pigments mélanoides (pigments bruns diffusibles) est examinée par culture des isolats d'actinobactéries sur les milieux ISP 6 et ISP7. La lecture des résultats est réalisée après 7 jours d'incubation par comparaison avec les milieux témoins non ensemencés, mais incubés dans les mêmes conditions.

2. 6. Détermination du type de l'acide diamino-2-6-pimélique (DAP) de la paroi cellulaire

La forme LL, *méso* ou hydroxylée de l'acide diamino-2-6-pimélique (DAP) pariétal, est étudiée à partir de l'hydrolysât des cellules d'actinobactéries prédatrices obtenu après traitement par HCL (6 N) à 110 °C pendant 6 h.

L'hydrolysât est séché sous vide puis suspendu dans 1 mL d'eau distillée et centrifugé pour écarter les débris. Ensuite, 15 mL d'hydrolysât, ainsi qu'un échantillon de 10 mL d'un mélange d'isomères méso, LL et DD de DAP sont chromatographiés sur couche mince de cellulose en utilisant un éluant composé de méthanol-eau distillée-HCl (6N)-pyridine (40 :13 :2 :5 : V/V/V/V).

Deux migrations de 10 cm dans la même direction sont effectuées. Le chromatogramme est séché à la température ambiante et révélé par pulvérisation d'une solution acétonique à 0,3 % de ninhydrine et chauffé à 110 °C pendant 5 min (Breton and Theilleux, 1989; Hasegawa *et al.*, 1983). Les différentes formes de DAP se caractérisent par des tâches, la forme LL migre en avant des deux autres formes.

2. 7. Utilisation des acides aminés

Le milieu utilisé est l'ISP 9 additionné d'1 g/L d'acide aminé. Les acides aminés testés sont : arginine, méthionine, tyrosine, tryptophane, asparagine, leucine, phénylamine, alanine et l'acide aspartique.

Avant l'ensemencement, les suspensions des isolats testés ont subi le lavage effectué au niveau du test d'utilisation des glucides.

La lecture des résultats est réalisée après 14 jours d'incubation à 30 °C. La comparaison de la croissance des actinomycètes en présence et en l'absence des acides aminés a été utilisée comme critère.

2. 8. Hydrolyse du Tween 80

La mise en évidence de l'hydrolyse du Tween 80 est examinée par la culture des isolats d'actinobactéries sur milieu de Sierra (Sierra, 1957).

La lecture des résultats est réalisée après 7 jours d'incubation à 28 °C. L'hydrolyse du tween 80 se manifeste par l'apparition d'une auréole opaque autour des colonies (Delmotte, 1958).

2. 9. Dégradation de l'amidon

La dégradation de l'amidon par les isolats d'actinobactéries est observée sur milieu contenant 10 g d'amidon mélangé avec 100 mL de gélose nutritive (Gordon and Mihm, 1957).

La lecture des résultats est réalisée après 7 jours d'incubation à 28 °C, le milieu est recouvert d'une solution de lugol, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun. Les zones claires autour des colonies indiquent l'hydrolyse de l'amidon.

2. 10. Dégradation de la caséine du lait

La mise en évidence de la dégradation de la caséine du lait est observée sur un milieu composé par 10 g de lait écrémé dissout dans 100 mL d'eau distillée (pH 7,5), puis stérilisé par autoclavage. 10 mL d'eau distillée contenant 3,6 g d'agar-agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri (Gordon et *al.*, 1974).

La lecture des résultats est réalisée après 7 jours d'incubation à 28 °C. Ainsi, la dégradation de la caséine du lait se traduit par l'apparition d'une auréole claire autour des colonies.

2. 11. Dégradation de la chitine

La mise en évidence de l'activité chitinolytique consiste en l'ensemencement des isolats d'actinobactéries par strie sur milieu chitine-agar (Annexe 1) (Hsu and Lockwood, 1975).

La lecture des résultats est réalisée après 10 jours d'incubation à 28 °C. L'apparition d'une zone claire autour des colonies révèle une activité positive.

2. 12. Croissance à différentes températures

Les isolats d'actinobactéries sont ensemencés sur milieu solide Bennett. Les boîtes sont incubées pendant 7 jours à sept différentes températures (4 °C, 15 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 45 °C et 50 °C).

La lecture des résultats a été effectuée après 7 jours d'incubation par comparaison avec le témoin, cultivé à 28 °C (Smaoui, 2010).

2. 13. Croissance à différents pH

La croissance des isolats d'actinobactéries a été étudiée sur milieu solide Bennett préparé à différents pH : 5, 7, 9 et 10. La croissance des actinobactéries est observée après 7 jours d'incubation.

2. 14. Croissance sur le milieu Bennett à différentes concentrations en NaCl

Les isolats d'actinobactéries sont ensemencés sur milieu solide Bennett additionné de NaCl pour obtenir les concentrations suivantes : 5 %, 8 %, 11 %, 15 % et 20 %. La croissance des actinobactéries est observée après 7 jours d'incubation.

2. 15. Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries prédatrices

L'identification génétique des actinobactéries est basée sur le séquençage partiel ou total de l'ARN et/ou l'ADN ribosomiaux (Ludwig et *al.*, 2012). Le séquençage de l'ADN 16S est choisi car chaque espèce contient dans son matériel génétique des zones spécifiques et uniques qui la caractérisent, ce qui va permettre une taxonomie plus précise des isolats d'actinobactéries au niveau intragénétique.

2. 15. 1. Extraction de l'ADN

Des erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de milieu de culture Bennett ont été inoculées avec les 4 isolats d'actinobactéries prédatrices. Les erlenmeyers sont agitées à 28 °C pendant 4 jours.

La culture est centrifugée à 8000 g pendant 10 min. La biomasse obtenue est lavée à deux reprises par l'eau bidistillée stérile. Une extraction de l'ADN de 200 mg de la biomasse est ensuite réalisée (Hopwood, 1985). Le culot est incubé successivement à 37 °C en présence

de 200 µL de lysosyme (5 mg/mL) et 200 µl de pronase (0,5 g/mL) puis à 55 °C en présence de 100 µL de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 1 %.

Après extractions successives avec du phénol, un mélange phénol /chloroforme, du chloroforme puis traitement avec de la RNase (40 µg/mL), l'ADN résultant est précipité avec de l'éthanol à 95 %, lavé avec de l'éthanol à 70 % et centrifugé à 1300 g pendant 5 min. Le culot obtenu est séché puis mis en suspension dans 100 à 150 µL d'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) stérile et maintenu à -20 °C jusqu'à utilisation.

2. 15. 2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Après extraction, les fragments d'ADN sont séparés sur gel d'agarose (0,8 à 1 %) dans du tampon bromure d'éthydiuim (TBE) en fonction de leur taille. La migration se fait dans un champ électrique de voltage constant.

2. 15. 3. Amplification d'ARNr 16S des actinobactéries

L'amplification de l'ADN est réalisée par la technique PCR (Polymérase Chain Reaction). Cette méthode consiste à employer deux amorces oligonucléotidiques : 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et le 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') complémentaires à des séquences spécifiques existants sur chacun des deux brins d'une molécule d'ADN (Lane, 1991). Les amorces et l'ADN sont dénaturés, hybridés et ensuite la synthèse de l'ADN est réalisée en utilisant l'ADN polymérase. Seul l'ADN se trouvant entre les deux amorces va être amplifié.

L'amplification est réalisée avec un thermocycleur en employant 50 µL du mélange réactionnel suivant : 1,5 U de la Taq polymérase, 10 µL du tampon d'amplification 5 fois concentré, 2,5 mM de chaque dNTP, 1 µM de chaque amorce et 100 ng d'ADN obtenu. Les conditions de PCR adoptées sont : 3 min à 98 °C, 30 cycles pendant 1 min à 94 °C, 1 min à 53 °C et 5 min à 72 °C. Ces trois dernières conditions sont effectuées pendant 35 cycles puis l'incubation est faite à 72 °C pendant 5 min.

La migration électrophorétique en gel d'agarose à 0,8 % (p/v) est menée dans le but de valider la taille du fragment de gène à amplifier, puis colorée au bromure d'éthidium.

Le séquençage du produit PCR obtenu est réalisé par MacroGen (Seoul, Korea). Les séquences obtenues sont comparées avec celles existantes dans la base de données en utilisant le programme 'NCBI Blast' disponible sur le site Web de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3. Résultats et discussions

3. 1. Etude morphologique des isolats d'actinobactéries prédateurs sélectionnés

3. 1. 1. *Microscope optique*

Après croissance des quatre isolats d'actinobactéries prédatrices pendant une semaine sur milieu Bennett, les lames et lamelles sont observées au microscope optique ($\times 400$). L'observation microscopique des mycéliums aériens montre une différence entre les quatre isolats à savoir la couleur du mycélium de substrat, la forme de la cellule et la morphologie des hyphes. Les quatre isolats ont un mycélium du substrat non fragmenté. En ce qui concerne la morphologie des hyphes des isolats, EMM111, EMM112 et EMM183 ont des hyphes dispersés de type (Freely dispersed) et de type agrégat (aggregate) pour EMM149 (Figure 25). Les isolats EMM111, EMM183 et EMM149 ont un mycélium aérien abondant alors que chez l'isolat EMM112, ce dernier est moins développé.

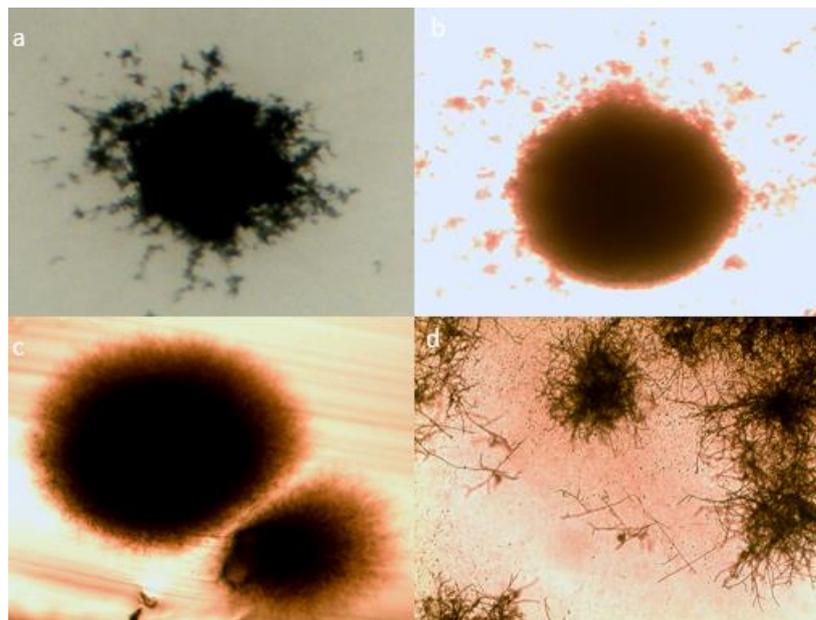


Figure 25. Aspect microscopique des colonies des isolats

(a) EMM111. **(b)** EMM112. **(c)** EMM183. **(d)** EMM149 après développement de 21 jours sur milieu Bennett (Vues au microscope optique $\times 400$)

3. 1. 2. *Microscope électronique*

L'observation au microscope électronique (MEB) des cultures des quatre souches d'actinobactéries a été réalisée après développement sur lamelles. La morphologie du mycélium aérien, mycélium du substrat, la chaîne des spores et la morphologie des spores, ont été observées après croissance de 14 jours.

Les 4 isolats produisent un mycélium du substrat non fragmenté surmonté par un mycélium aérien où l'on note la présence de chaînes de spores de type polyspora, rectiflexible, se regroupant par leurs extrémités (Figure 26, 27, 28 et 29). Les spores sont à surface lisse.

Les spores représentent un critère fondamental dans la taxonomie des actinobactéries. La présence de spores, leur nombre, leur forme, leur mobilité, l'aspect de leur surface (lisse ou rugueux), leur position sur les hyphes, la présence de sporanges, de sclérotés, ou de synnémata, sont des critères importants de la classification morphologique des actinobactéries (Schofield and Schaal, 1981; Shirling and Gottlieb, 1966).

Chez les *Streptomycètes*, les spores surmontent le mycélium aérien. Les chaînes de spores du genre *Streptomyces* sont soit droites (type Rectis), sinuées (type Rectiflexibilis) ou spirales (type spirales) (Anibou, 2008) . Ce qui suggère l'appartenance des 4 isolats au genre *Streptomyces*.

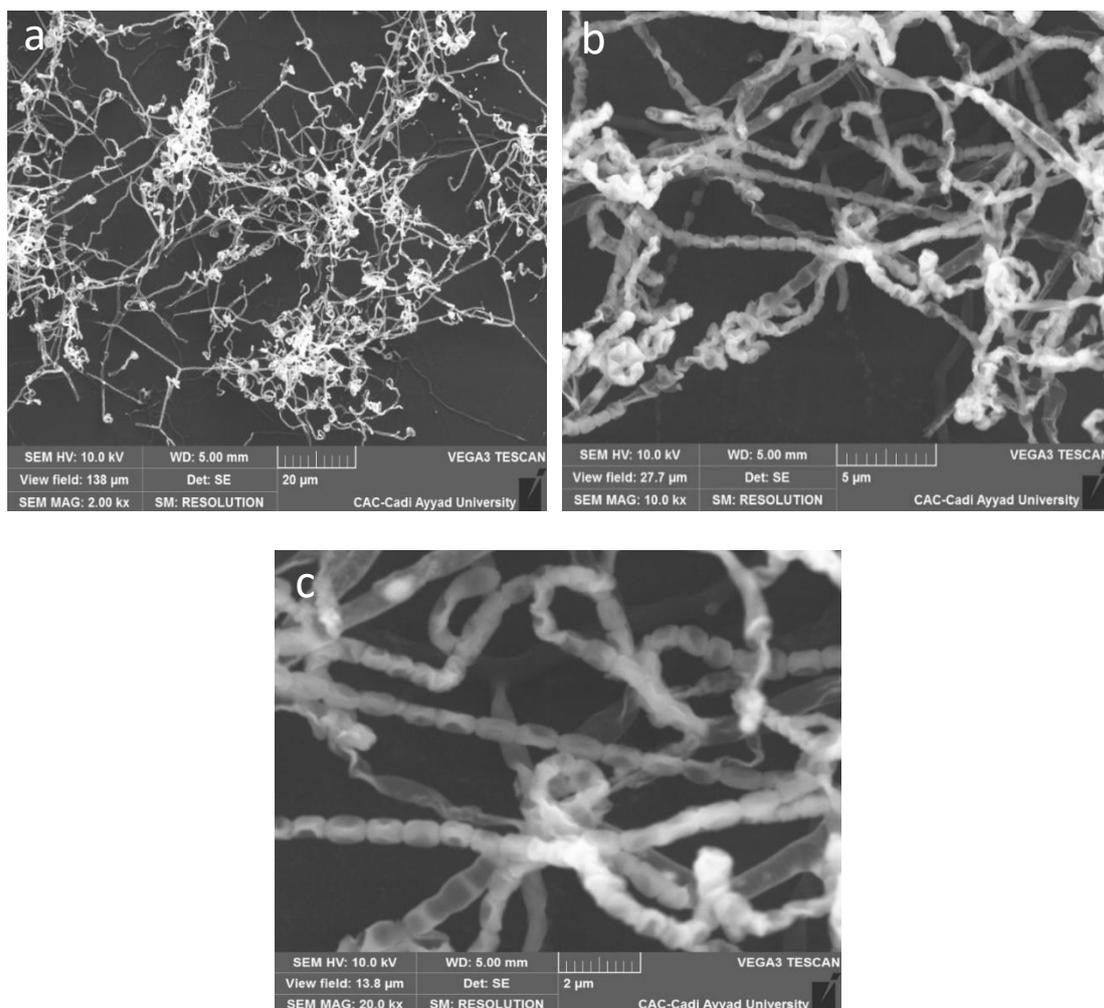


Figure 26. Observation des spores, du mycélium aérien et du substrat de l'isolat EMM111 (a × 2000, b × 10000, c × 20000)

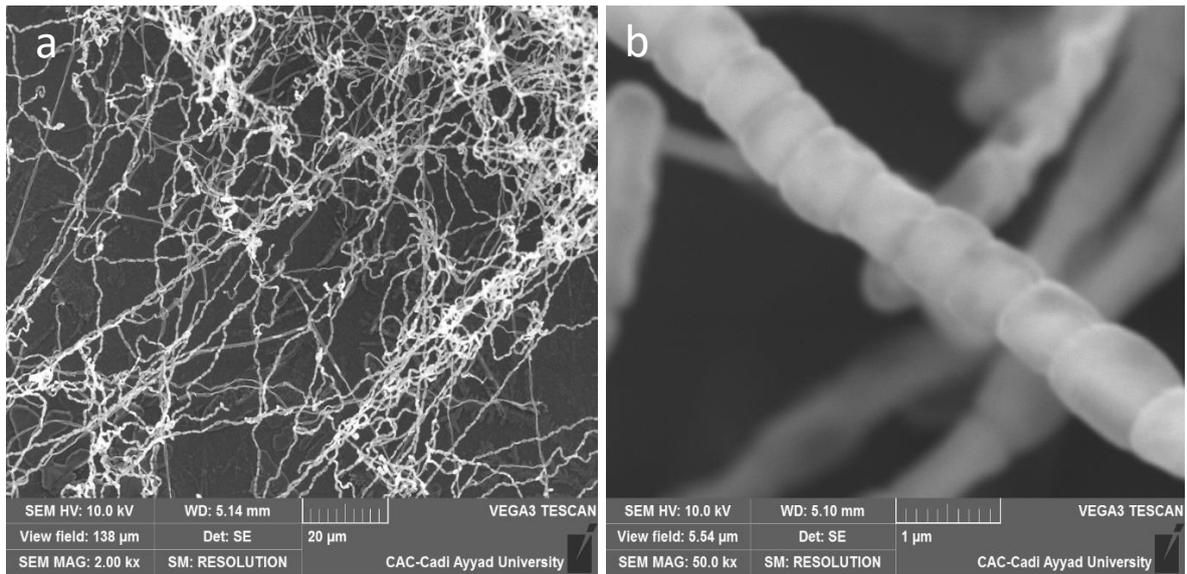


Figure 27. Observation des spores, du mycélium aérien et du substrat de l'isolat EMM112
(a \times 2000, b \times 50000)

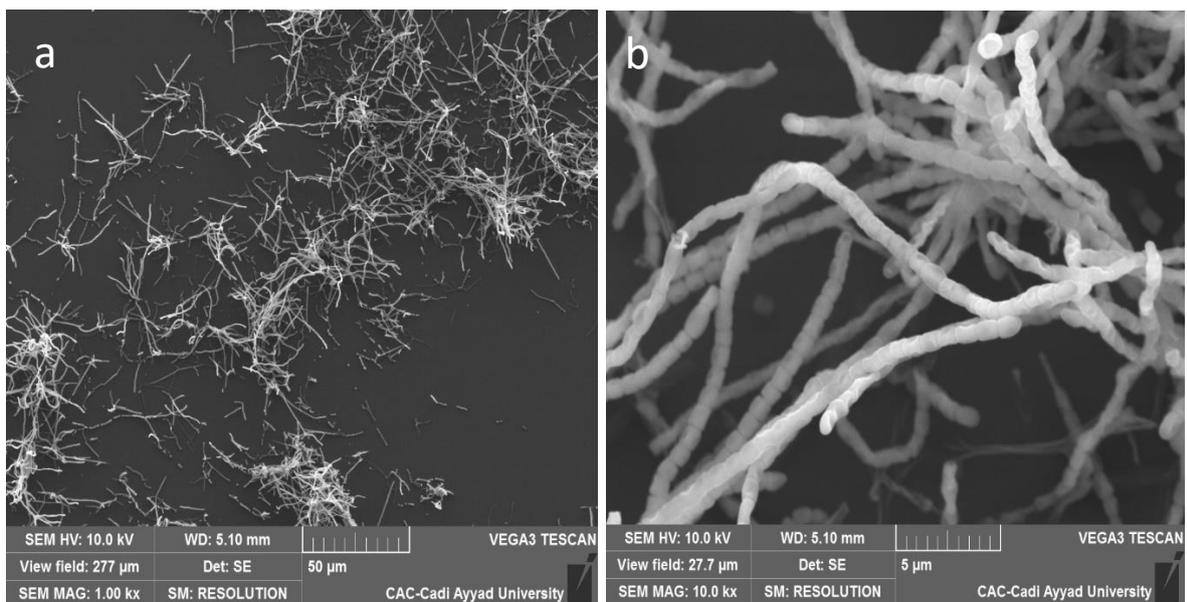


Figure 28. Observation des spores, du mycélium aérien et du substrat de l'isolat EMM183 (a \times 1000, b \times 10,000)

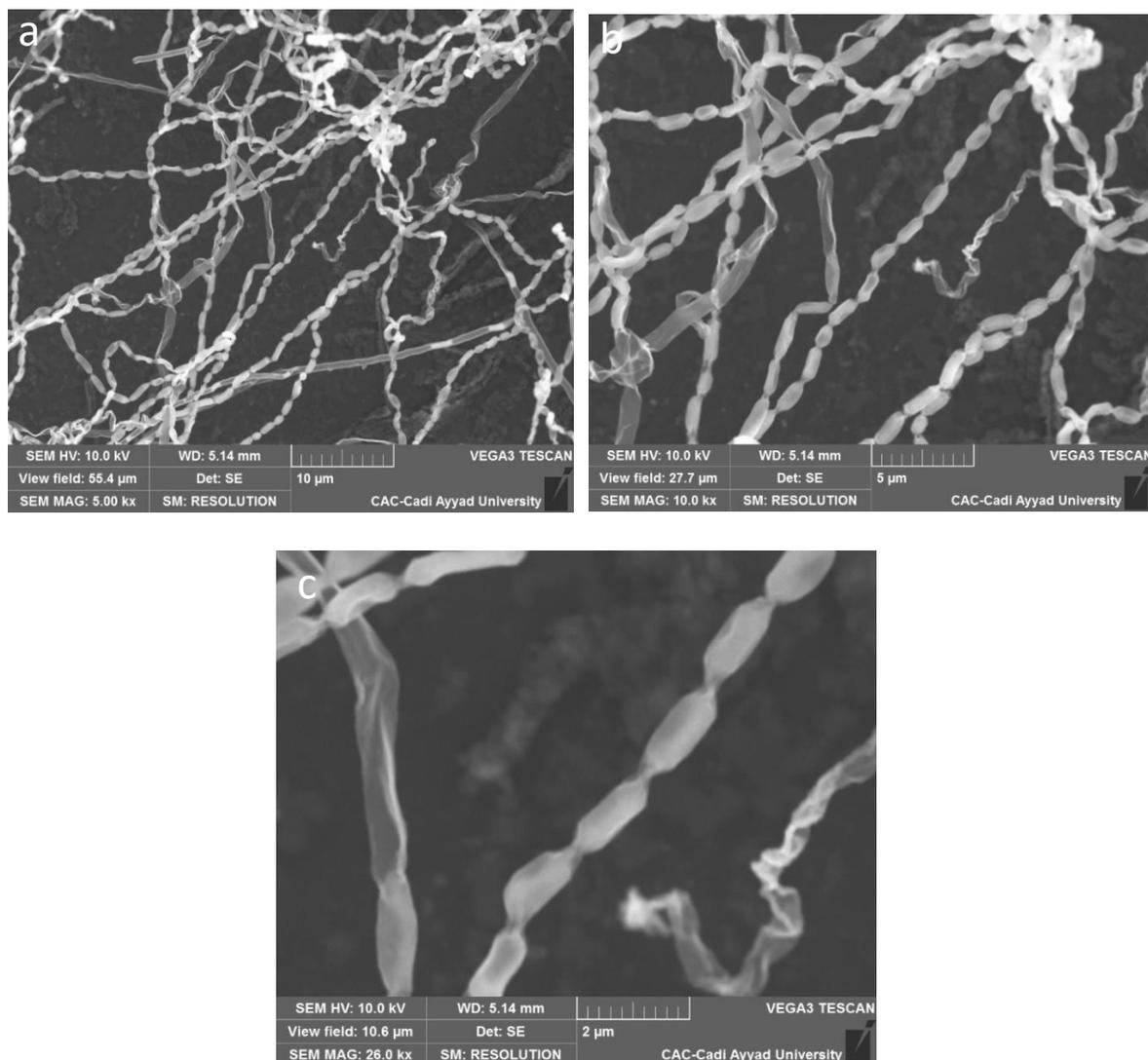


Figure 29. Observation des spores, du mycélium aérien et du substrat de l'isolat EMM194 (a \times 5000, b \times 10000, c \times 26,000)

3. 2. Caractéristiques culturelles des souches d'actinobactéries prédatrices

Les caractéristiques phénotypiques et culturelles des 4 isolats d'actinobactéries prédatrices ont été examinées conformément aux recommandations du Projet international *Streptomyces* (ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966). Les caractéristiques révélées des quatre isolats telles que la croissance, la couleur du mycélium aérien et celui du substrat, la formation des spores, ainsi que la présence de pigments mélanoïdes dans la gélose sont reportés dans le Tableau 13. Ces caractéristiques fournissent une indication sur le genre d'actinobactérie (Ludwig et al., 2012).

Les résultats ainsi obtenus montrent que les quatre isolats ont pu croître sur tous les milieux recommandés utilisés. Les isolats EMM111, EMM183 et EMM149 ont formé un

mycélium aérien abondant sur tous les milieux. Pour l'isolat EMM112, la sporulation et le mycélium aérien sont très abondants sur le milieu Bennett. L'isolat EMM111 produit des pigments diffusibles dans tous les milieux sauf l'ISP6 et Bennett. L'isolat EMM183 produit un seul pigment dans le milieu ISP2 et l'isolat EMM194 produit aussi un seul pigment (marron) dans le milieu ISP3. Cependant, EMM112 ne présente aucun pigment diffusible sur tous les milieux de culture utilisés.

L'isolat EMM111 est capable de former des mycéliums aériens et des mycéliums de substrats de couleurs variées (gris, blanc, bleu, beige et violet) selon le milieu de culture utilisé, alors que les autres isolats montrent moins de diversité.

Le mycélium aérien de l'isolat EMM112 est de couleur orange sur le milieu ISP2 et Bennett tandis qu'il est gris pour les autres milieux utilisés. Le mycélium de substrat est noir sur tous les milieux sauf le milieu ISP2 sur lequel il est marron.

L'isolat EMM183 présente une couleur blanche du mycélium aérien et du mycélium de substrat pour la plupart des milieux utilisés. Sur le milieu ISP7, les deux mycéliums sont de couleur rose. Le mycélium aérien est de couleur verte sur le milieu Bennett.

Pour l'isolat EMM194, la couleur du mycélium aérien et du mycélium de substrat varie entre le blanc et le jaune dans presque tous les milieux utilisés. Sur les milieux ISP1 et ISP3, le mycélium de substrat est de couleur vert alors que sur le milieu ISP7 il est marron.

L'ensemble de ces caractéristiques culturelles montrent que les quatre isolats d'actinobactéries prédatrices EMM111, EMM112, EMM183 et EMM149 sont différents. Ils présentent en particulier des différences de coloration des mycéliums et de production de pigments.

Tableau 13. Caractéristiques culturales et présence de pigment mélanoïde des isolats d'actinobactéries sélectionnés

	EMM111	EMM112	EMM183	EMM149
Croissance				
ISP1	+++	++	+++	+++
ISP2	+++	+	+++	+++
ISP3	+++	+	+++	+++
ISP4	+++	+	+++	+++
ISP5	+++	+	+++	++
ISP6	+++	+	+++	++
ISP7	+++	+	+++	++
Bennett	+++	+++	+++	+++
Mycélium aérien				
ISP1	Beige	Gris	Blanc	Jaune
ISP2	Beige	Orange	Blanc	Blanc
ISP3	Beige	Gris	Blanc	Jaune
ISP4	Beige	Gris	Blanc	Jaune
ISP5	Beige	Gris	Blanc	Blanc
ISP6	Beige	Gris	Blanc	Blanc
ISP7	Beige	Gris	Rose	Blanc
Bennett	Gris	Orange	Vert	Blanc
Mycélium du substrat				
ISP1	Blanc	Noir	Blanc	Vert
ISP2	Blanc	Marron	Beige	Blanc
ISP3	Gris	Noir	Blanc	Vert
ISP4	Blue	Noir	Blanc	Blanc
ISP5	Violet	Noir	Blanc	Blanc
ISP6	Beige	Noir	Blanc	Blanc
ISP7	Blanc	Noir	Rose	Marron
Bennett	Blanc	Noir	Blanc	Blanc
Pigmentation				
ISP1	Bleu claire	Absence	Absence	Absence
ISP2	Orange	Absence	Marron jaunâtre	Absence
ISP3	Marron	Absence	Absence	Marron
ISP4	Violet	Absence	Absence	Absence

ISP5	Gris	Absence	Absence	Absence
ISP6	Absence	Absence	Absence	Absence
ISP7	Absence	Absence	Absence	Absence
Bennett	Absence	Absence	Absence	Absence
Sporulation				
ISP1	++	+	++	+++
ISP2	+++	+	+++	+++
ISP3	+++	+	+++	+++
ISP4	+++	+	+++	+++
ISP5	+++	+	+++	++
ISP6	++	+	+++	++
ISP7	+++	+	+++	++
Bennett	+++	+++	+++	+++

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

3. 3. Caractéristiques physiologiques et production de pigment mélanoïde des isolats d'actinobactéries sélectionnés

Les caractéristiques physiologiques des quatre isolats EMM111, EMM112, EMM183 et EMM149 sont illustrées dans le Tableau 14. Les résultats obtenus montrent que les isolats EMM111, EMM183 ont utilisé tous les glucides testés. L'isolat EMM112 assimile 9 substrats carbonés : fructose, glucose, mannitol, arabinose et faiblement galactose, lactose, mannose, dextrine et maltose. L'isolat EMM149 assimile tous les glucides testés à l'exception du fructose et mannose.

Les 4 isolats ensemencés sur les deux milieux ISP6 et ISP7 (Tableau 13) n'ont produit aucun pigment mélanoïde. Ces pigments sont des produits de la transformation de la tyrosine en DOPA-mélanine, responsable de la couleur. Ils possèdent des propriétés radioprotectrices, antioxydantes et peuvent protéger le microorganisme contre les ultraviolets (Vinarov et *al.*, 2002).

L'étude des activités de dégradation des quatre isolats montrent qu'ils sont capables de dégrader le Tween 80, l'amidon, la caséine du lait, l'arginine, la méthionine, l'asparagine, la leucine, l'alanine et l'acide aspartique. A l'exception de la phénylamine qui est dégradée par tous les isolats sauf EMM194, le tryptophane est dégradé par tous les isolats sauf EMM112 et EMM194. Cependant, la chitine et la tyrosine sont dégradées uniquement par EMM94.

L'optimum de croissance enregistré pour les quatre isolats est compris entre 28 et 30 °C. Seul l'isolat EMM111 présente une croissance moyenne à 50 °C, ce qui montre qu'il est thermo tolérant. Les quatre isolats préfèrent un pH neutre et tolèrent des concentrations en NaCl allant jusqu'à 5 %. Seul l'isolat EMM111 peut tolérer une concentration plus élevée (jusqu'à 8 %) de NaCl.

Tableau 14. Caractéristiques physiologiques des isolats d'actinobactéries prédateurs

Isolats	EMM111	EMM112	EMM183	EMM149
Utilisation des glucides				
Saccharose	+	-	+	+
Galactose	+	+	+	+
Lactose	+	+/-	+	+
Mannose	+	+/-	+	-
Mannitol	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	+	+
Arabinose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+
Dextrine	+	+/-	+	+
Maltose	+	+/-	+	+
Activité de dégradation				
Tween 80	+	+	+	+
Amidon	+	+	+	+
Caséine du lait	+	-	+	+
Chitine	-	-	-	+
Arginine	+	+	+	+
Méthionine	+	+	+	+
Tyrosine	-	-	-	+
Tryptophane	+	-	+	-
Asparagine	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	+
Phénylamine	+	+	+	-
Alanine	+	+	+	+
Aspartique	+	+	+	+
Croissance à différentes températures				
4°C	-	-	-	-
15°C	+/-	-	+/-	+/-
25°C	+/-	+/-	+/-	+/-

28°C	+	+	+	+
30°C	+	+/-	+	+/-
35°C	+	+/-	+/-	+/-
45°C	+/-	-	+/-	+/-
50°C	+/-	-	-	-
Croissance à différents pH				
5	+/-	+/-	+/-	+/-
7	+	+	+	+
9	+/-	+/-	+/-	+/-
Croissance à différentes concentrations en NaCl				
5	+	+	+	+
8	+	-	-	-
11	-	-	-	-
15	-	-	-	-

Légende : + développement ; - : absence de développement ; +/- : développement modéré

3. 4. Détermination du type de l'acide diamino-2-6-pimélique (DAP) de la paroi cellulaire

L'une des méthodes les plus rapides pour l'identification des actinobactéries jusqu'au genre est l'analyse chimiotaxonomiques de l'isomère du DAP constituant de la paroi des actinobactéries (Lechevalier, 1980). L'analyse chimiotaxonomique a montré que les 4 isolats prédateurs EMM111, EMM112, EMM183 et EMM194 contiennent l'isomère LL-diaminopimélique (LL-DAP). Ce dernier est retrouvé dans le genre *Streptomyces*.

3. 5. Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries prédatrices

Les résultats de l'identification moléculaire ont permis de confirmer l'appartenance des 4 isolats d'actinobactéries présentant une activité de prédation EMM111, EMM112, EMM183 et EMM149 au genre *Streptomyces* (Tableau 15). Cette identification confirme celle faite par l'étude chimiotaxonomique. En effet, le séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S de l'isolat EMM111 a permis l'obtention d'une séquence nucléotidique ayant 99 % de similarité avec *Streptomyces griseoflavus*. En outre, la comparaison des profils de l'utilisation de substrats carbonés et l'absence de la production des pigments mélanoides montrent une ressemblance entre l'isolat EMM111 et la souche *S. griseoflavus* puisque cette dernière est capable de métaboliser l'ensemble des sucres testés (Othman et al., 2008).

Par ailleurs, la souche *S. griseoflavus* est connue pour sa capacité à produire une variété de molécules bioactives y compris aborycin et colabomycins (Grote et al., 1988; Potterat et al., 1994), un polycétide contre les bactéries à Gram + (Imai et al., 1989), des enzymes à intérêt

industriel tel que l'amylase (Tang-um and Niamsup, 2012). Toutefois, à notre connaissance aucune activité de prédation de *S. griseoflavus* n'a été mentionnée dans la littérature, nos résultats sont ainsi les premiers à assigner une telle activité à cette espèce d'actinobactérie.

Le séquençage de l'isolat EMM112 a permis l'obtention d'une séquence nucléotidique ayant 100 % de similarité avec *Streptomyces coelicoflavus*. La description faite au niveau du Bergey's Manual de la souche *S. coelicoflavus*, confirme l'identité de l'isolat EMM112. *S. coelicoflavus* est connue pour la production des enzymes très puissantes inhibitrices de l' α -amylase (Geng and Bai, 2008). Un nombre très limité de travaux décrivent les activités de cette espèce et l'activité de prédation de *S. coelicoflavus* mise en évidence dans le présent travail, est tout à fait originale.

Le séquençage de l'isolat EMM183 a permis son affiliation avec une homologie de 100 % à *Streptomyces mutabilis*. La description faite au niveau du Bergey's Manual de la souche *S. mutabilis*, ainsi que son profil d'utilisation de substrats carbonés (Krasil'Nikov, 1960) confirment l'identité de l'isolat EMM183.

Par ailleurs, *S. mutabilis* est connue pour la production d'antibiotiques (Fehr et al., 1989, 1977) et une activité antifongique très intéressante (Belghit et al., 2016; Toumatia et al., 2015). Nous sommes les premiers à assigner une telle activité de prédation à cette espèce d'actinobactérie.

L'identification moléculaire de l'isolat EMM194, a permis l'obtention d'une séquence nucléotidique ayant 99 % de similarité avec *Streptomyces champavatii*. La description faite par (Aouar et al., 2012; Hosny et al., 2010) des caractéristiques morphologiques culturelles, physiologiques et celles décrites au niveau du Bergey's Manual de la souche *S. champavatii* montrent que l'isolat EMM194 présente une grande ressemblance avec elle. En outre, *S. champavatii* est connue pour la production d'antibiotiques et antifongiques appelés champamycin A, champamycin B et champavatin (Rao and Narasimha Rao, 1967) et pour son activité chitinolytique remarquable (Hosny et al., 2010). A notre connaissance, aucune activité de prédation n'a été mentionnée dans la littérature et nos résultats sont les premiers à assigner une telle activité à cette espèce d'actinobactérie.

L'approche moléculaire comme outil d'identification taxonomique des actinobactéries a validé la diversité de nos isolats, qui appartiennent au genre *Streptomyces*. Ces résultats sont en accord avec d'autres rapports précédents, montrant que les *Streptomyces* sont des prédateurs non obligatoires (Baig et al., 2019; Casida, 1988; Kumbhar et al., 2014).

Tableau 15. Comparaison des gènes de séquence de l'ARNr 16S des isolats avec ceux de la banque de bases des données NCBI BLAST

Isolat	Pourcentage de similarité (%)	Souche	Numéro d'accèsion
EMM111	99	<i>Streptomyces griseoflavus</i>	NR_042291.1
EMM112	100	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	NR_041175.1
EMM183	100	<i>Streptomyces mutabilis</i>	NR_044139.1
EMM149	99	<i>Streptomyces champavatii</i>	NR_115669.1

4. Conclusion

L'étude taxonomique des isolats sélectionnés, présentée dans ce chapitre, a été réalisée selon les directives de l'International *Streptomyces* Project (ISP), notamment les caractères morphologiques, culturels, physiologiques et moléculaires.

La combinaison de ces différentes techniques taxonomiques a permis de valider la diversité, la classification de nos isolats et leur identification. Les quatre isolats appartiennent au genre *Streptomyces*. Les souches que nous avons étudiées appartiennent aux espèces suivantes :

- L'isolat EMM111, a été identifié comme étant *Streptomyces griseoflavus* avec un pourcentage de similarité de 99 %.
- L'isolat EMM112, a été identifié comme étant *Streptomyces coelicoflavus* avec un pourcentage de similarité de 100 %.
- L'isolat EMM138, a été identifié comme étant *Streptomyces mutabilis* avec un pourcentage de similarité de 100 %.
- L'isolat EMM149, a été identifié comme étant *Streptomyces champavatii* avec un pourcentage de similarité de 99 %.

Ces résultats sont originaux car ils décrivent pour la première fois les quatre espèces étudiées comme étant des actinobactéries prédatrices. D'autre part, nos travaux confirment que le genre *Streptomyces* est un réservoir de souches d'actinobactéries prédatrices non obligatoire à explorer.

Chapitre IV

Thermochimiolyse, outil chimiotaxonomique pour le suivi de l'interaction prédateur-proie

1. Introduction

La biomasse microbienne en co-culture peut être évaluée par différentes méthodes incluant le dénombrement, le dosage d'ATP, la mesure d'activité enzymatique et les méthodes physiologiques. Cependant, l'utilisation de biomarqueurs moléculaires permettrait de suivre l'évolution des bactéries dans une communauté de manière efficace et quantitative (Quezada et *al.*, 2007).

La chimiotaxonomie est basée sur l'étude des variations chimiques dans la classification et l'identification des bactéries (Goodfellow and Minnikin, 1985). Ces caractères ont été surtout étudiés au niveau des parois cellulaires. Les composés majeurs utilisés pour la chimiotaxonomie sont les peptidoglycane, les sucres, les phospholipides, les acides aminées et les acides gras (Goodfellow et *al.*, 1993; Ibrahimi et *al.*, 2019). Leur distribution et leur variété structurale en font de bons marqueurs chimiotaxonomiques (Dhanasekaran and Jiang, 2016). Les moyens les plus rapides pour la caractérisation des bactéries sont l'acide diaminopimélique (DAP), les phospholipides et les acides gras (Dhanasekaran and Jiang, 2016; Ibrahimi et *al.*, 2019; Lechevalier, 1980).

Les acides gras sont des constituants essentiels et les plus abondants de la membrane cytoplasmique (Dhanasekaran and Jiang, 2016; Kaneda, 1991). Leur distribution varie d'une souche à l'autre (Ibrahimi et *al.*, 2019; Sasser, 1990; Miyagawa et *al.*, 1979), ils peuvent donc être utilisés comme biomarqueurs pour identifier les bactéries (Quezada et *al.*, 2007), estimer la structure de la communauté microbienne et l'activité métabolique dans l'environnement (El Fels et *al.*, 2015; Zelles, 1999).

De la même façon, il est possible de suivre l'évolution des micro-organismes en co-culture à l'aide des acides gras pour confirmer la prédation de la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (MRSA) par l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111.

Différentes approches peuvent être utilisées pour l'analyse des acides gras. Cependant, une technique très efficace est la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse, qui est un outil très puissant permettant la caractérisation de la matière organiques synthétiques ou naturelles (Quezada et *al.*, 2007; Santos et *al.*, 2018). La pyrolyse avec dérivatisation *in situ*, appelée thermochimiolyse, couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse est une méthode efficace et fiable pour déterminer la

distribution des acides gras dans une matrice environnementale (El Fels et *al.*, 2015; Santos et *al.*, 2018; Zelles, 1999). L'utilisation d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) permet de transformer les acides gras polaires formés lors de la pyrolyse, en esters méthyliques apolaires évitant ainsi leur dégradation (Clifford et *al.*, 1995; Shadkami and Helleur, 2010).

L'objectif de ce chapitre est de démontrer que la thermochemiolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse peut être utilisée comme méthode d'analyse chimiotaxonomique des bactéries. D'autre part il s'agira d'évaluer la capacité de l'*Actinobactérie* prédatrice à détruire la bactérie *Staphylococcus aureus* résistante à la Méricilline (SARM). A notre connaissance le présent travail constitue la première étude qui met en évidence la relation prédateur-proie par chimiotaxonomie.

2. Matériel et Méthodes

La prédation a été étudiée en milieu liquide, en présence de la proie *Staphylococcus aureus* résistante à la méricilline (SARM) (NCTC 12493) et l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111 qui a montré de bons résultats de prédation dans le chapitre 1. Des prélèvements ont été effectués au début de l'expérience (T0), après 8 jours (T8) et après 15 jours (T15).

2. 1. Co-culture

2. 1. 1. Préparation de la proie et du prédateur

➤ Inoculum général de la proie

La bactérie SARM estensemencée sur une gélose nutritive pendant 24 h à 37 °C, une suspension est préparée dans de l'eau physiologique stérile. Une fiole d'erlenmeyer de 100 mL contenant 25 mL de bouillon nutritif estensemencée à raison de 1 % d'inoculum général, puis incubée pendant 24 h à 37 °C sous agitation.

➤ Inoculum général du prédateur

L'actinobactérie *S. griseoflavus* EMM111 estensemencée sur milieu Bennett gélosé. Après 7 jours de culture à 28 °C, une suspension dense de fragments mycéliens et de spores est préparée dans l'eau physiologique stérile. Une fiole d'erlenmeyer de 100 mL contenant 25 mL de milieu Bennett liquide estensemencée à raison de 1 % d'inoculum général, puis incubée pendant 7 jours à 28 °C sous agitation.

➤ Inoculum lavé

Les cultures de la proie et du prédateur sont centrifugées stérilement à 4500 g pendant 10 min, le surnageant est écarté, le culot est lavé trois fois à l'eau distillée et repris dans 25 mL d'eau distillée stérile.

2. 2. Préparation de la co-culture

L'inoculum de la co-culture est préparé par 100 mL de cellules d'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 lavée avec une concentration de 10^{12} UFC/mL et 100 mL de cellules de la proie lavée (SARM) à une concentration de 10^{12} UFC/mL, le volume final de chaque Erlenmeyer est 200 mL. Les essais de co-culture sont réalisés pendant 2 semaines à 28 °C sous agitation constante. Les échantillons sont prélevés au début de l'expérience (T0), après 8 jours (T8) et après 15 jours (T15). Les échantillons sont centrifugés à 4000 tr/min pendant 10 min à 10 °C, les biomasses sont collectées et lyophilisées.

2. 3. Thermochimioanalyse analytique (TMAH-Py-GC-MS)

La pyrolyse est effectuée à l'aide d'un pyrolyseur Frontier Lab (EGA 2020), équipé d'un passeur d'échantillon AS-1020E. Le pyrolyseur est couplé à un chromatographe en phase gazeuse (GC) et à un spectromètre de masse quadrupolaire Shimadzu (GCMS QP2010 Ultra).

La séparation des composés en GC est réalisée sur une colonne capillaire SLB-5MS (Supelco) de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre, 0,25 microns d'épaisseur de phase. La température de l'injecteur est réglée à 250 °C, l'injection est faite en mode split avec un rapport de division 100/1. La température de la colonne est programmée de 50 à 300 °C à 5 °C. min⁻¹ et maintenu à 300 °C pendant 14 min.

L'interface entre le GC et le spectromètre de masse est chauffée à 280 °C. L'ionisation en spectrométrie de masse se fait par impact électronique à 70 eV avec une température de source de 220 °C. L'acquisition est réalisée en mode full scan entre 50 et 600 uma avec une vitesse de balayage de 2 scans par seconde.

Environ 500 µg d'échantillon, lyophilisé et broyé sont placés dans une cupule en inox et humectés par 5 µL d'une solution méthanolique (50/50 v/v) d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH). L'échantillon ainsi préparé est pyrolysé à 600 °C pendant une minute.

La pyrolyse des acides gras en présence d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) permet leur observation sous forme d'esters méthyliques. Ces derniers sont moins polaires, plus stables thermiquement ce qui augmente la résolution chromatographique. D'autre part le seuil de détection d'un ester méthylique étant plus bas, la sensibilité en spectrométrie de masse est augmentée.

Les pyrogrammes sont exploités à l'aide du logiciel Shimadzu GCMS solution. Les composés sont identifiés sur la base de leur temps de rétention en GC et par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la base de données NIST, ceux de composés de référence (mélange commercial d'esters méthyliques Aldrich) et avec les données de la littérature. L'abondance relative P_i de chaque produit de thermochimolyse est calculée par le rapport entre l'aire de son pic chromatographique et la somme des aires de tous les pics identifiés (El Fels et

al., 2015) :
$$P_i = \frac{a_i}{\sum_1^n a_i}$$

2. 4. Quantification

Chaque mélange est pyrolysé en triplicat. La quantification est effectuée de la manière décrite par Collard et *al.* (2015). L'ester méthylique de l'acide hexadécanoïque (C₁₆) est utilisé comme étalon externe. La quantité (en µg) d'un composé donné est calculée en utilisant l'équation (Collard et *al.*, 2015):

$$[\text{Standard en } \mu\text{g}] = ([\text{surface standard}] - b)/a$$

a : pente de la droite de calibration, b : ordonnée à l'origine.

Les concentrations relatives sont exprimées par rapport à la masse de l'échantillon pyrolysé, en mg/g d'échantillon.

2. 5. Analyse statistique

Afin de confirmer statistiquement les résultats l'expérience, nous avons étudié la variation de la quantité (mg/g) de chaque acides gras méthylé à l'intérieur des groupes prédateur (*Streptomyces griseoflavus* EMM111 -proie (SARM), T0, T8 et T15) et pour faire apparaître les biomarqueurs spécifiques de chaque groupe, nous avons appliqué une analyse multivariée (analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH). L'ACP est appliquée à la matrice de corrélation entre les variables acides gras méthylé. Les expériences sont répétées trois fois avec chaque essai indépendant. Les matrices de corrélations, les coefficients de corrélations entre les variables et les deux axes F1 et F2 et la projection des

variables dans l'espace des axes F1 et F2 ont été obtenues avec le Logiciel XLSTAT Version 2016.02.27444.

2. 5. 1. Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode fondamentale en statistique descriptive multidimensionnelle non supervisée (Giansante et *al.*, 2003). Cette technique linéaire exploratoire permet de traiter simultanément un jeu de données quantitatives lorsque n individus sont décrits par $d > 3$ variables (Chang et *al.*, 2016). L'objectif de l'ACP est de trouver une matrice de projection qui maximise la variance de jeux de données après la projection, de manière à restituer la majeure partie de l'information initiale (Asteris et *al.*, 2015; Khanna et *al.*, 2015). Autrement dit, on cherche à définir k nouvelles variables combinaisons linéaires des p variables initiales qui feront perdre le moins d'information possible (Chang et *al.*, 2016). Cette technique exploratoire entraîne la compression des données (Ibrahimi et *al.*, 2019). Par conséquent, l'utilisation de l'ACP permet la mise en évidence des relations globales existant entre les variables, la recherche d'éventuels échantillons aberrants et de faire ressortir les corrélations entre les variables d'entrée.

2. 5. 2. Classification ascendante hiérarchique (CAH)

La classification ascendante hiérarchique (CAH) est une technique statistique d'analyse non supervisée (Granato et *al.*, 2018). La CAH classe les individus en différentes classes ou sous-groupes ayant des caractéristiques similaires (De Juan et *al.*, 2009). Au début, la CAH considère que chaque individu représente une classe (Boubou, 2007). Ensuite, les individus sont agrégés en deux ou plusieurs classes appropriées (selon une similarité) pour former une nouvelle classe jusqu'au regroupement de l'ensemble de l'échantillon. (Boubou, 2007). Le résultat de la CAH est présenté dans un dendrogramme, un tracé qui montre l'organisation des échantillons et ses relations sous forme d'arbre (Granato et *al.*, 2018). La hauteur des branches indique leur niveau de proximité (Patras et *al.*, 2011).

L'application de la CAH exige d'effectuer plusieurs choix, comme la distance qui permettra de calculer la proximité entre deux individus (ou deux classes), ou encore le critère d'agrégation (Boubou, 2007).

Dans notre étude, nous avons utilisé le critère de Ward comme critère d'agrégation qui ne s'applique que si on utilise la distance euclidienne pour mesurer la distance interclasses. La distance est centrée et réduite pour éviter que l'échelle des variables n'influe sur les résultats.

3. Résultats et discussions

3.1. Chimiotaxonomie de la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la Méthicilline (SARM) et l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111

Les pyrogrammes obtenus à partir de la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la Méthicilline (SARM) et de l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111 (Figure 30 et 31) montrent que les esters méthyliques sont les principaux composés détectés. La distribution ou abondance relative de chaque acides gras méthylé est présentée sous forme d'histogramme (Figure 32 et 33). Les distributions des esters pour la souche *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) et pour l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 sont différentes, ce qui traduit une composition différente de la paroi cellulaire et une différence dans la capacité biosynthétiques de chaque espèce (Gago et al., 2011; Voytsekhovskaya et al., 2018). En effet, McNabb et al., (1997) ont suggéré que les bactéries peuvent être réparties en deux groupes. Les membranes cellulaires des bactéries de type I sont essentiellement constituées d'acides gras à chaînes ramifiées alors que celles de type II sont dominées par les acides gras saturés ou monoinsaturés à chaîne linéaire.

Dans notre étude, la bactérie SARM et l'actinobactéries prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 contiennent respectivement 76 % et 70 % d'acides gras à chaîne ramifiée (Figures 32 et 33). Ainsi, les deux bactéries étudiées appartiennent au type I selon la classification de McNabb. Les acides gras à chaîne ramifiée *iso*- et *antéiso*- en C₁₅, C₁₇ et ou C₁₆br sont les principaux constituants les bactéries Gram-positives (Amir et al., 2010; Parkes, 1987; Zelles, 1999), tandis que les acides gras à chaîne linéaire sont majoritaires chez les bactéries Gram-négatives.

Les acides gras identifiés sous forme méthylée pour la bactérie SARM sont caractérisés par une distribution large allant du C₁₂ au C₂₁. Les principaux composés (57,2 % des acides gras identifiés) sont les acides ramifiés *iso* et *anteiso* en C₁₅, ce qui est en accord avec la littérature (Welch, 1991). Le rapport *iso* sur *anteiso* est de 0,44. Au contraire, les acides gras observés pour l'actinobactérie prédatrice EMM111 sont dominés par un mode court compris entre C₁₂ et C₁₈ avec l'acide ramifié en C₁₆ comme composé majoritaire (26,2 %). De plus, le rapport *iso* / *anteiso* en C₁₅ est de 0,9, ce qui représente le double de la valeur observée pour SARM. L'ester méthylique ramifié en C₁₄ est également l'un des principaux composés de l'actinobactérie *S. griseoflavus* EMM111 (9,6 %) alors qu'il est minoritaire chez SARM (4,2 %). La distribution des acides gras méthylés observée pour l'actinobactérie étudiée est

cohérente avec plusieurs publications précédentes (McNabb et al., 1997; Quezada et al., 2007; Ritchie et al., 2000; Vestal and White, 1989). Une autre particularité de la bactérie SARM par rapport à l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 est la présence d'acides gras à longue chaîne (C₁₉ à C₂₁) qui ne sont pas détectés chez cette dernière. De plus, l'ester de l'acide stéarique (C₁₈) est plus abondant chez SARM avec une abondance relative de 6,6 %, alors que chez l'actinobactérie prédatrice il ne représente que 0,8 %. En revanche, les esters C₁₅, C_{16:1} et C_{17:1} sont relativement abondants dans l'actinobactérie prédatrice EMM111 et ne sont présents qu'à l'état de traces chez SARM.

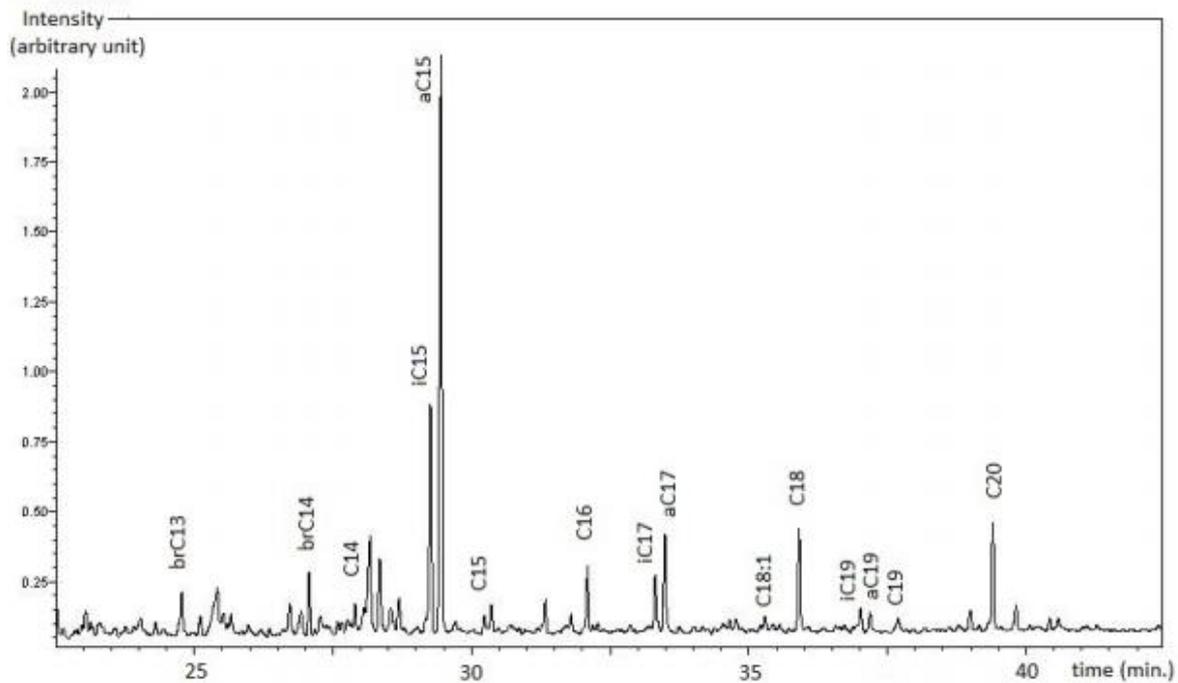


Figure 30. Pyrogramme (TMAH, 600 °C) de la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la Méricilline (SARM)

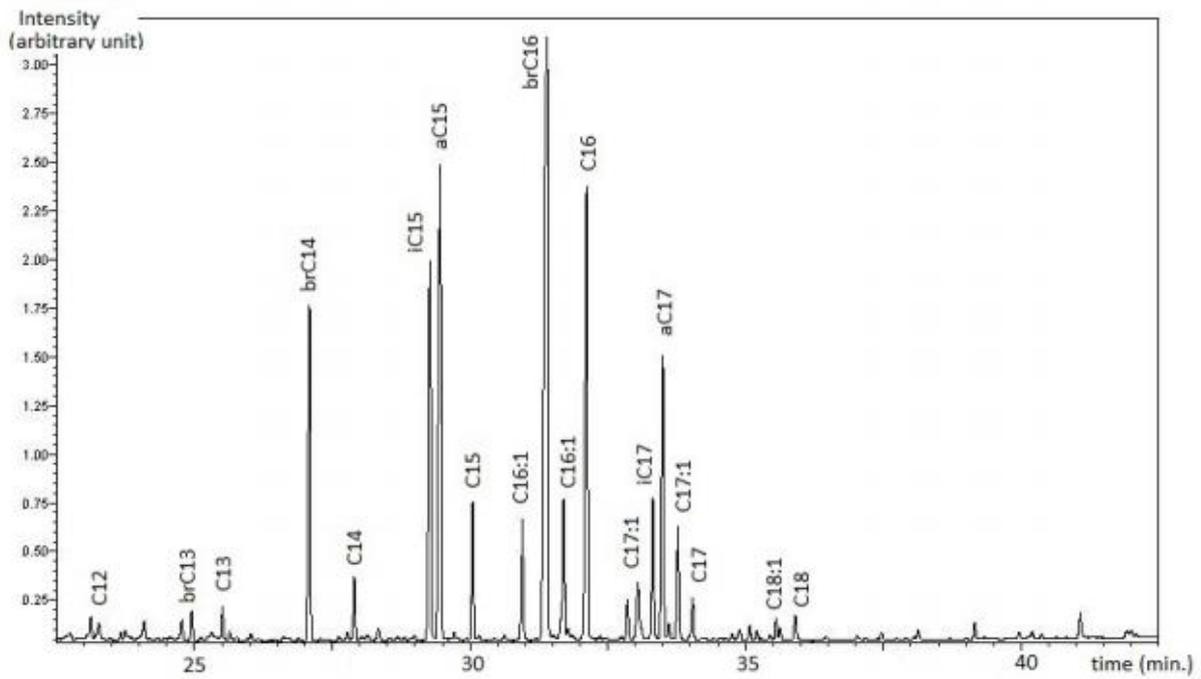


Figure 31. Pyrogramme (TMAH, 600 °C) de l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111

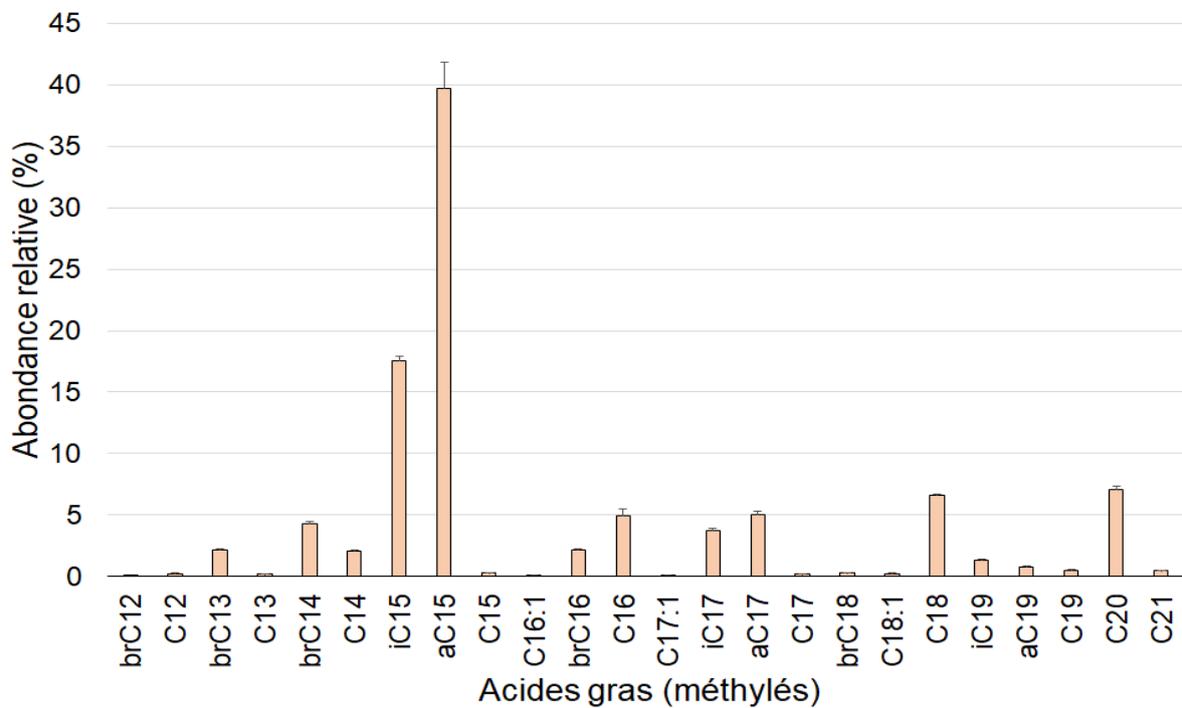


Figure 32. Abondance relative (%) des acides gras (méthylés) dans la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la Méricilline (SARM)

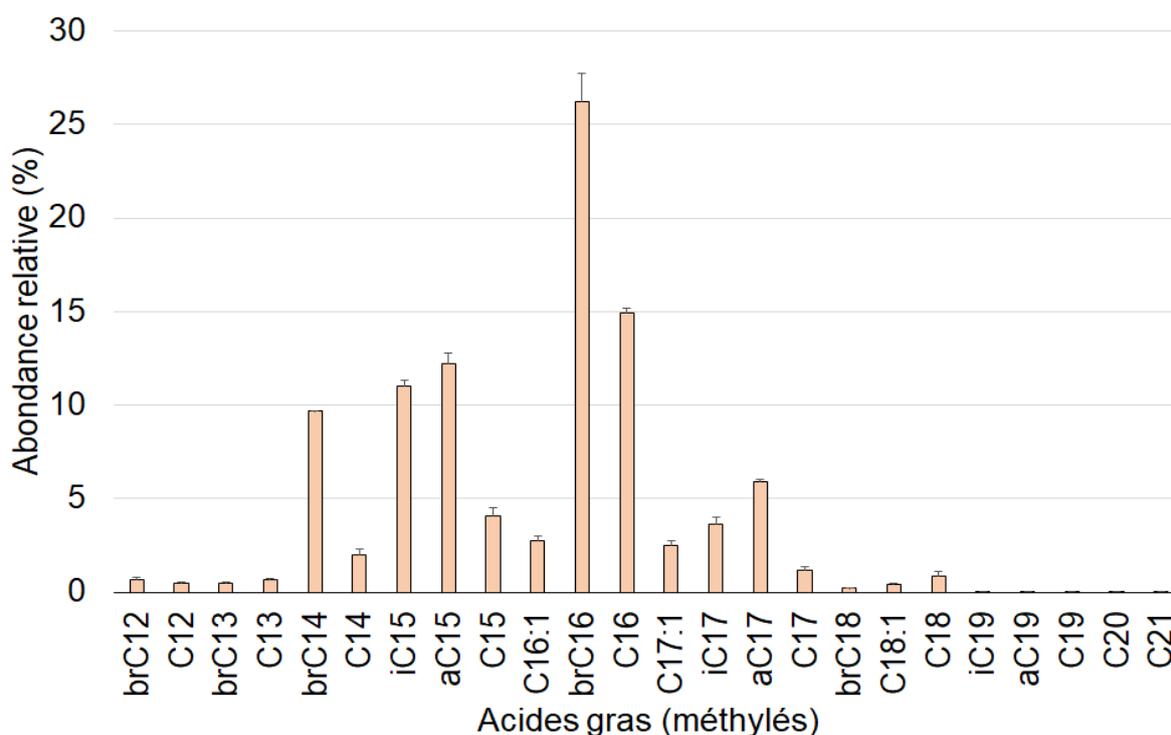


Figure 33. Abondance relative (%) des acides gras (méthylés) dans l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111

3. 2. Suivi de la prédation

Les différences de distributions des acides gras méthylés des deux bactéries étudiées sont utilisées pour évaluer la capacité de l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 à éliminer SARM.

Les variations des distributions des acides gras méthylés au cours de la co-culture après (0, 8 et 15 jours) sont présentées dans la Figure 34. Au début de l'expérience (T0), les acides gras ressemblent fortement à la signature de l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 (Figure 26), avec une abondance élevée en acides gras ramifiés à chaîne courte (C14, C15, C16). Le rapport *iso* sur *anteiso* en C15 qui est deux fois plus élevé pour l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 que pour SARM (3.1), a augmenté pendant la co-culture, passant de 0,75 (T0) à 0,96 (T15) (Tableau 16). La dernière valeur étant proche de celle observée chez l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111. Les acides gras méthylés ramifiés C14 et C16 qui sont prédominants chez l'actinobactérie et minoritaires chez SARM ont augmenté entre T0 et T15, tandis que, les acides gras méthylés linéaires C18 et C20 qui sont abondants pour SARM ont diminué entre T0 et T15.

Finalement, après deux semaines (T15), les acides gras méthylés présentent une distribution comprise entre C₁₂ et C₁₈. Par ailleurs, les esters méthyliques C₂₀ qui sont plus détectés à T15 étaient identifiés comme spécifique de SARM (voir section chimiotaxonomie).

L'évolution de la distribution des acides gras au cours de la co-culture a été particulièrement marquée par une augmentation des acides gras considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques de l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111, parallèlement à une diminution des acides gras marqueurs chimiotaxonomiques de la proie SARM. Cette évolution confirme l'activité de prédation.

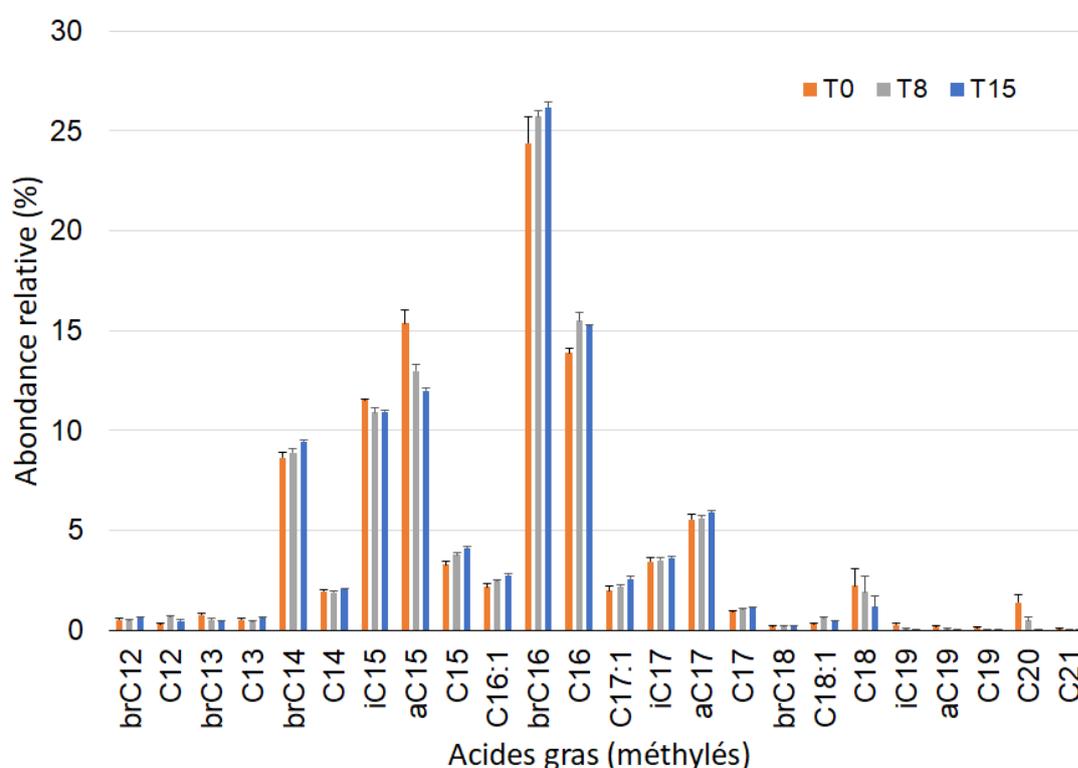


Figure 34. Abondance relative (%) des acides gras (méthylés) au cours de la co-culture (T0, T8 et T15)

Tableau 16. Rapports représentatifs : [ramifié en C₁₄ + ramifié en C₁₆] sur acides gras totaux ; [C₁₈ + C₂₀] sur les esters méthyliques totaux ; *iso*-C₁₅ sur *antéiso*-C₁₅

	SARM	<i>S. griseoflavus</i>	Co-culture		
		EMM111	T0	T8	T15
[rC ₁₄ +rC ₁₆]/ Total	6.4	35.9	33	34.6	35.6
[C ₁₈ +C ₂₀]/ Total	13.6	0.8	3.6	2.4	1.1
iC₁₅/aC₁₅	0.4	0.9	0.7	0.8	0.9

3. 3. Quantification et analyse statistique

3. 3. 1. Quantification

Les mesures semi-quantitatives sont basées sur la normalisation (%i = surface du composé i/ surfaces des composés identifiés (Collard et *al.*, 2015). Une quantification plus précise permettant de comparer les quantités d'acides gras méthylés produits par la thermochimioolyse de chaque bactérie est nécessaire pour réaliser une analyse statistique. Dans notre étude, nous avons utilisé l'acide hexadécanoïque comme étalon externe (Collard et *al.*, 2015) (Tableau 24). La quantité des acides gras méthylés libérés par la thermochimioolyse de l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 (83,1 mg/g) est significativement plus élevée que celle produite par la thermochimioolyse de SARM (17,2 mg/g). Ceci est cohérent avec les résultats des études précédentes qui ont démontré que les actinobactéries sont une source importante d'acides gras (Voytsekhovskaya et *al.*, 2018). Par ailleurs, la quantité des acides gras méthylés libérés par thermochimioolyse est passée de 43,9 mg/g à T0 à 73,8 mg/g après 15 jours de co-culture. Ce résultat met en évidence le remplacement de la population de proie (SARM) par l'actinobactérie prédatrice.

Tableau 17. Quantité des acides gras méthylés obtenus par thermochemolyse-GCMS de SARM, de *S. griseoflavus* EMM111 et au cours de la co-culture (T0, T8 et T15) en (mg/g)

Composé	<i>Streptomyces griseoflavus</i> EMM111	SARM	T0	T8	T15
C_{12br}	0.5±0.1	-	0.2±0	0.2±0	0.4±0
C₁₂	0.4±0.1	-	0.1±0	0.4±0	0.4±0
C_{13br}	0.4±0.1	0.3±0	0.3±0	0.3±0	0.3±0
C₁₃	0.5±0.1	-	0.2±0	0.2±0	0.4±0
C_{14br}	8±0.9	0.7±0.1	3.7±0.6	5.2±0.7	6.9±0.6
C₁₄	1.6±0.4	0.3±0	0.8±0.1	1.1±0.1	1.5±0.1
iC₁₅	9.1±0.8	3±0.3	5±0.8	6.4±0.9	8±0.7
aC₁₅	10.1±0.7	6.8±0.9	6.7±1.2	7.6±1	8.8±0.9
C₁₅	3.4±0.8	-	1.4±0.2	2.2±0.3	3±0.3
C_{16:1}	2.2±0.2	-	1.3±0	1.4±0.1	2±0.1
C_{16br}	21.6±1.2	0.3±0	10.7±2.1	15.1±2	19.3±1.9
C₁₆	12.4±1.3	0.8±0	6.1±1	9.1±1.2	11.2±1.1
C_{17:1}	2±0.1	-	0.5±0	0.8±0	0.12±0
iC₁₇	3±0.6	0.6±0	1.5±0.1	2±0.3	2.6±0.3
aC₁₇	4.9±0.7	0.8±0	2.4±0.3	3.3±0.5	4.3±0.5
C₁₇	0.9±0.3	-	0.4±0	0.6±0	0.8±0.1
C_{18br}	0.1±0	-	0.1±0	0.1±0	0.1±0
C_{18:1}	0.3±0	-	-	-	0.2±0
C₁₈	0.7±0.2	1.1±0.1	0.9±0.3	1.1±0.4	0.8±0.4
iC₁₉	-	0.2±0	0.1±0	-	-
aC₁₉	-	0.1±0	-	-	-
C₁₉	-	-	-	-	-
C₂₀	-	1.2±0.1	0.6±0.2	0.2±0	-
C₂₁	-	<0.1	-	-	-

3. 3. 2. Analyse statistique

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode d'analyse multivariée qui permet d'extraire simultanément un maximum d'information de la somme importante de données quantitatives obtenue. L'ACP permet de déterminer les différentes relations qui existent entre les variables et les phénomènes à l'origine de ces relations sur un minimum d'axes (Mouissi and Alayat, 2016). Cette méthode est largement utilisée pour interpréter l'évolution des acides gras méthylés au cours des processus biologiques (El Fels et al., 2015; Quezada et al., 2007).

Dans notre étude, l'ACP est effectuée sur une matrice de données constituée de 24 variables acide gras méthylé présents dans SARM, l'actinobactérie et la co-culture (T0, T8 et T15). De plus, l'ACP permet d'attribuer chaque ester méthylique biomarqueur à une souche donnée. Elle permet aussi de faire ressortir les points communs et les différences entre les bactéries et les co-cultures.

Les valeurs propres de la matrice de corrélation permettent de mesurer le pourcentage de la variance expliquée par chaque factoriel (Tableau 19). L'histogramme des valeurs propres montre que la première valeur propre vaut 24,78 et représente 90,77 % de la variabilité (Figure 35). Cela signifie que si on représente les données sur un seul axe, 90,77 % de la variabilité totale sera préservée. La deuxième valeur propre est 1,84 et représente 7,77 % de la variabilité. La variabilité cumulée est 98,48 %. Ces deux valeurs propres sont significatives parce qu'elles sont supérieures à 1. Par conséquent, les deux premières valeurs propres correspondent à 98,48 % de variabilité totale ce qui indique que les deux premiers axes sont hautement suffisants pour représenter l'information dans sa globalité.

Autrement dit, la représentation de nos données sur les deux premiers axes factoriels est de bonne qualité. Ainsi, l'application de l'ACP a permis de réduire nos données initiales qui étaient constituées de $N = 24$ variables (esters méthyliques) à un nombre inférieur de dimensions ($N = 2$) permettant une interprétation plus facile.

Les résultats de l'ACP des acides gras méthylés de SARM, l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 et au cours de la co-culture (T0, T8 et T15) sont illustrés dans la Figure 36.

Les 2 premiers axes de l'ACP expriment 98,48 % de l'inertie totale du jeu de données ; cela signifie que 98,48 % de la variabilité des données est représentée dans ce plan, ce qui est un pourcentage extrêmement élevé. Par conséquent le premier plan représente parfaitement la quasi-totalité de l'information.

La composante principale ACP, est déterminée selon deux composantes (1 et 2), ces deux composantes déterminent 98,48 % de l'ensemble des informations avec un taux de variabilité entre les esters méthyliques de l'ordre de 90,78 % pour la composante 1, et de 7,70 % pour la composante 2 (Figure 36).

Le domaine I regroupe les acides gras indicateurs de SARM C_{19} , iC_{19} , C_{19} , C_{20} , C_{21} . Ils sont négativement et positivement influencés respectivement par PC1 et PC2. Le domaine I

coïncide avec SARM. Le domaine II regroupe une seule variable qui est le C₁₈ influencé négativement par PC1 et PC2. Il coïncide avec T0 et T8. Finalement, le domaine III regroupe les acides gras indicateurs de l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 C₁₅, C_{16:1} et C₁₇ qui sont positivement corrélés avec PC1 et faiblement corrélés négativement avec PC2, à l'exception de C_{16:1} qui est positivement corrélé avec PC1 et PC2. Le domaine III comprend également les acides gras d'origine non spécifiques : C_{12br}, C₁₃, C_{14br}, C₁₄, iC₁₅, C_{16br}, C_{16:1}, C₁₆, C₁₆, aC₁₇, iC₁₇, C_{17:1} et C_{18br}. Ils sont positivement corrélés avec PC1 et PC2, à l'exception de C_{16br} et C₁₆ qui ont montré une corrélation négative faible avec PC2. Ce domaine coïncide avec l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 et avec T15.

Une distinction claire entre la chimiotaxonomie de SARM et *S. griseoflavus* EMM111 est confirmée par ACP. Par conséquent, l'ACP est un outil valide pour faciliter l'exploitation de données complexes tout en préservant les tendances et l'information initiale. De plus, l'ACP montre la dissimilitude entre SARM et la co-culture à T15 et la similarité entre *S. griseoflavus* EMM111 et la co-culture à T15 ce qui met en évidence la prédation de SARM par l'actinobactérie. Par conséquent, l'ACP est une méthode utile pour observer les différences dans la structure des communautés bactériennes présentes dans une co-culture qui aidera à surveiller le processus de prédation.

Ces observations pour les acides gras méthylés de SARM, l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111 et la co-culture (T0, T8 et T15) sont confirmées par la méthode de classification hiérarchique (Figure 37). Les relations entre les esters méthyliques en fonction de leurs profils ont été séparées en trois classes :

- Classe 1 : *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline (SARM)
- Classe 2 : Actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111 et co-culture à T15
- Classe 3 : Co-culture à T0 et T8

La forte corrélation des groupes acides gras méthylés de l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 et de la co-culture à la fin de l'expérience (T15) confirme l'activité de prédation exercée par l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 sur la proie SARM.

Tableau 18. Variance totale expliquée

	F1	F2	F3	F4
Valeur propre	21,786	1,848	0,336	0,030
Variabilité (%)	90,777	7,700	1,400	0,123
% cumulé	90,777	98,477	99,877	100,000

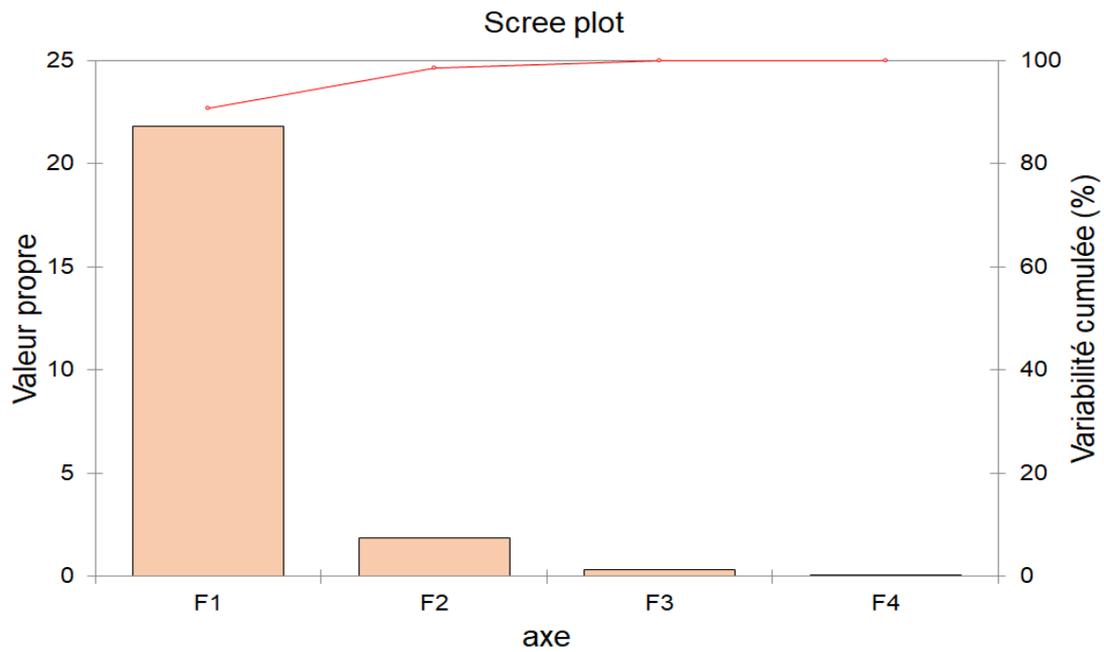


Figure 35. Scree plot des valeurs propres à partir de l'ACP

4. Conclusion

La thermochimioolyse couplée à la GC-MS a été utilisée pour caractériser la bactérie *Staphylococcus aureus* résistante à la Mécilline (SARM) et l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111. Les acides gras libérés par la méthode pyrolytique et détectés sous forme d'esters méthyliques ont montré des distributions différentes d'une bactérie à l'autre. Ces différences de distributions ont permis de réaliser la chimiotaxonomie. La bactérie SARM présente une distribution dominée par les acides gras ramifiés (*iso* et *anteiso*) en C₁₅, avec un rapport *iso* sur *anteiso* de l'ordre de 0,4 et par les acides linéaires C₁₈ et C₂₀. La distribution des acides gras méthylés dans l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 est dominée par les composés ramifiés en C₁₄ et C₁₆ et un rapport *iso* sur *anteiso* C₁₅ de l'ordre 0,9. De plus, la quantité totale des acides gras méthylés libérés par thermochimioolyse est significativement plus élevée chez l'actinobactérie *S. griseoflavus* EMM111 étudiée (83 mg/g) que chez la bactérie SARM (17 mg/g).

La prédation suivie pendant 15 jours via une co-culture d'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 et de SARM est mise en évidence par une augmentation de la quantité totale d'acides gras méthylés et par un changement drastique de leur distribution qui ressemble fortement à celle de l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 après 15 jours de co-culture.

L'approche statistique utilisant l'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) a permis une affiliation fiable des acides gras méthylés biomarqueurs avec chaque souche correspondante et a confirmé les changements dans leur distribution, confirmant la prédation pendant la co-culture. La CAH a permis d'établir une distinction entre SARM et *S. griseoflavus* EMM111. L'ACP a montré la corrélation des acides gras méthylés à longue chaîne (>C₁₈) avec SARM, alors que les composés ramifiés à chaînes courtes sont corrélés avec l'actinobactérie prédatrice EMM111 et T15.

Au bilan, cette étude a validé l'utilisation de la thermochimioolyse comme outil chimiotaxonomique pour identifier les bactéries et suivre leur devenir au cours de l'activité de prédation. En effet, cette technique produit des empreintes spécifiques à chaque espèce. L'évolution des acides gras méthylés comme biomarqueurs a démontré la capacité de l'actinobactérie prédatrice à attaquer et à inhiber les bactéries multirésistantes. L'utilisation des actinobactéries prédatrices est une nouvelle stratégie prometteuse pour combattre les bactéries

multirésistantes. Ainsi, l'identification des molécules impliquées dans la prédation est nécessaire. Elle fera l'objet du prochain chapitre.

Chapitre V

Essais préliminaires d'extraction des molécules impliquées dans la prédation

1. Introduction

Les actinobactéries sont les bactéries les plus prolifiques en tant que productrices d'antibiotiques (Manivasagan et *al.*, 2014). Plus particulièrement, le genre *Streptomyces* qui est responsable de la production de très nombreux antibiotiques (Mast and Stegmann, 2019). Ces molécules sont utilisées dans différents domaines tels que l'industrie pharmaceutique, la cosmétique, le secteur agro-alimentaire et l'élevage.

Les antibiotiques sont produits en biotechnologie par un processus de fermentation (Couillerot et *al.*, 2014), dans lequel les actinobactéries sont cultivées dans des cuves de à 150000 appelées fermenteurs, contenant un milieu de croissance liquide (Vijayakumar et *al.*, 2015). Les conditions de cultures à savoir la concentration en oxygène, la température, le pH et les niveaux de nutriments doivent être optimaux et contrôlés (Pfefferle et *al.*, 2000; Vijayakumar et *al.*, 2015).

Une fois le processus de fermentation terminé, les molécules bioactives sont présentes en concentrations relativement faibles dans le milieu de culture liquide complexe, contenant les cellules de l'actinobactérie, les composants du milieu et de nombreux métabolites (Stanbury et *al.*, 2013 ; Smaoui, 2010). Afin d'identifier la ou les molécules responsable(s) de l'activité antibiotique, il est donc nécessaire de réaliser une extraction suivie d'un fractionnement. Cependant, il est impossible de trouver un protocole standard étant donné que la variabilité des molécules impliquées dans ce type de mécanisme (Cannell, 1998). Par conséquent, la combinaison de différentes techniques analytiques est nécessaire afin d'élucider la structure des composés responsables de l'activité antibactérienne.

Faisant suite aux étapes de screening entreprises au cours de notre travail, nous avons procédé dans ce chapitre pour la première fois à l'extraction, à la purification et à la caractérisation des molécules impliquées dans la prédation par la souche *Streptomyces griseoflavus* EMM111. Les différentes étapes de ce travail d'identification sont :

- Extraction des produits actifs par un solvant organique à partir du milieu liquide.
- Fractionnement par chromatographie sur couche mince (CCM) et sur colonne de silice.
- Analyse des fractions obtenues par différentes méthodes en fonction de leur polarité : GC-MS, LC-MS, RMN.

2. Mode opératoire

2. 1. Préculture en batch

Des erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de milieu de culture Bennett sontensemencées par l'actinobactérie *S. griseoflavus* EMM111 productrices de molécules bioactives. Les erlenmeyers sont ensuite incubés sous agitation à 28 °C pendant 7 jours. Puis, la culture est centrifugée stérilement à 4500 g pendant 10 min, le surnageant est écarté, le culot est lavé trois fois à l'eau physiologique distillée et repris dans 25 mL d'eau physiologique stérile.

2. 2. Préculture de la proie

Des erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de bouillon nutritif, sontensemencés par la bactérie *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (SARM) (NCTC 12493). Les erlenmeyers sont ensuite incubés sous agitation à 37 °C pendant 24 h. Puis, la culture de la proie est centrifugée stérilement à 4500 g pendant 10 min, le surnageant est écarté, le culot est lavé trois fois à l'eau physiologique et repris dans 25 mL d'eau physiologique stérile.

2. 3. Culture en fermenteur

L'inoculum de la co-culture est préparé par 100 mL de cellules d'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 lavée avec une concentration de 10^8 UFC/mL et 100 mL de cellules de la proie lavée (SARM) à une concentration de 10^{12} UFC/mL. Chaque préculture est introduite stérilement pour ensemenecer 1,5 L de l'eau physiologique dans un fermenteur de 2 L. L'agitation est assurée par un arbre central et l'aération par le passage d'air filtré à travers de coton cardé. Le débit d'air est de 30 L/min et l'agitation est de 250 t/min. Des prélèvements sont effectués de façon régulière afin de suivre (i) la croissance par ensemencement en stries à la surface des boites de gélose additionnées de cellules de la proie lavée et (ii) l'activité antibactérienne de l'actinobactérie *S. griseoflavus* EMM111 vis-à-vis du SARM par la technique des puits.

2. 4. Extraction

Après culture de 15 L d'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 pendant 15 jours à 28 °C, le mycélium est séparé du surnageant par filtration puis centrifugation (15 min à 5000 t/min). L'extraction du surnageant est effectuée par 3 fois 500 mL d'acétate d'éthyle (Figure 38). L'activité antibactérienne des extraits organiques et aqueux vis-à-vis de SARM est

testée par la technique des disques et la technique des puits. Finalement, les extraits organiques sont obtenus après distillation du solvant, sous vide à 40 °C.

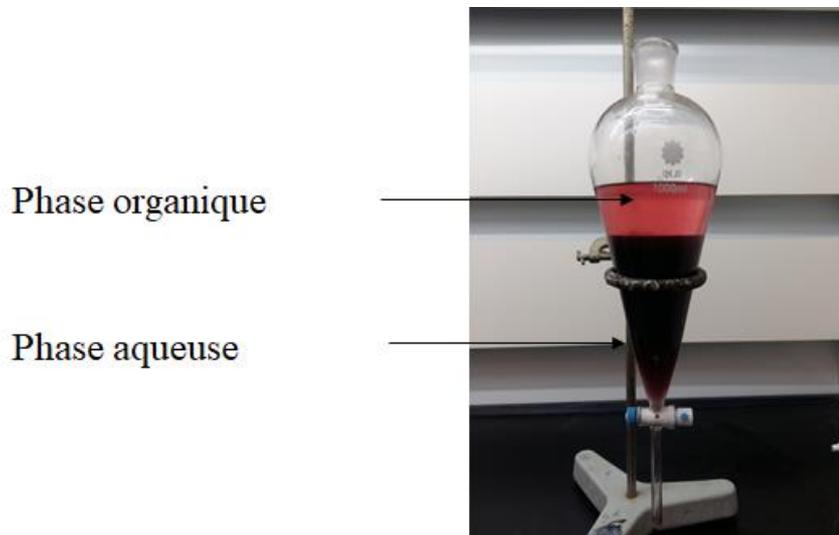


Figure 38. Extraction du surnageant de *S. griseoflavus* EMM111 par l'acétate d'éthyle

2. 5. Révélations microbiologiques

2. 5. 1. Technique des disques

Des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imbibés de 20 µL d'extraits organiques. Après séchage à 37 °C sous courant d'air chaud, les disques (trois disques pour chaque extrait) sont déposés sur des boîtes contenant le milieu Muller Hintonensemencées avec le micro-organisme test (*M. luteus* (ATCC381), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 8739), SARM (NCTC 12493) et *E. coli* résistante (ATCC 35218)).

2. 5. 2. Technique des puits

Cette technique consiste à préparer des boîtes de Muller Hinton avec des puits de volume identique. Après solidification de 5 mL de milieu de culture, on ajoute 10 mL du même milieu avec des billes de verre stérile. Ceci permet d'avoir des puits pouvant recevoir un volume de 60 µL de la fraction. Les boîtes de pétri sont inondées par les micro-organismes tests (*M. luteus* (ATCC381), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 8739), SARM (NCTC 12493) et *E. coli* résistante (ATCC 35218) après 2 h de diffusion à 4 °C. Les zones d'inhibition apparaissent après incubation à 30 °C pendant 24 h.

2. 6. Evaluation de l'activité antibactérienne des fractions par la technique de micro-dilution en milieu liquide sur microplaque à 96 puits

2. 6. 1. Préparation de l'inoculum

Un inoculum est réalisé sur gélose nutritive à partir d'une culture bactérienne de 24 h. La densité cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile à 0,5 Mc Ferland, ce qui correspond à une concentration finale de 10^6 UFC/mL.

2. 6. 2. Préparation de la gamme de concentration des fractions

La fraction à tester est dissoute dans des microtubes stériles, contenant du DMSO à 4 %. La fraction est diluée dans l'eau distillé stérile de manière à générer une gamme de dilution de base 2.

2. 6. 3. Inoculation

L'inoculation des puits est faite de la manière suivante (Figure 39) :

La colonne 12 est réservée au témoin négative DMSO

- Les rangés de A à F sont réservés aux fractions. Leurs colonnes de 1 à 11 correspondent à des concentrations de 100 μ L de la fraction, 90 μ L de bouillon Muller Hinton (BMH) et 10 μ L de l'inoculum bactérien. Le volume final de chaque puit est 200 μ L.
- La rangé G correspond à 200 μ L de bouillon Muller Hinton (BMH), qui va servir à contrôler une éventuelle contamination du milieu de culture.
- La rangé H contient 190 μ L de bouillon Muller Hinton (BMH) et 10 μ L de l'inoculum bactérien, qui va servir à contrôler la qualité de la croissance de la souche bactérienne.

Les plaques sont ensuite recouvertes puis incubées à 37 °C.

2. 6. 4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu. Après 18 heures d'incubation à 37 °C, la CMI de la fraction est déduite à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance bactérienne. La lecture est effectuée après l'ajout de 50 μ L de chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT, Sigma-Aldrich). La présence de bactéries vivantes est détectée par la coloration en rose de l'INT.

2. 6. 5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0,01 % de germes survivants. A l'aide d'une anse calibrée à 2 μL , les contenus des puits dans lesquels aucun trouble n'a été observé ont été prélevés et ensemencés sur une gélose Mueller-Hinton en commençant par le tube de la CMI.

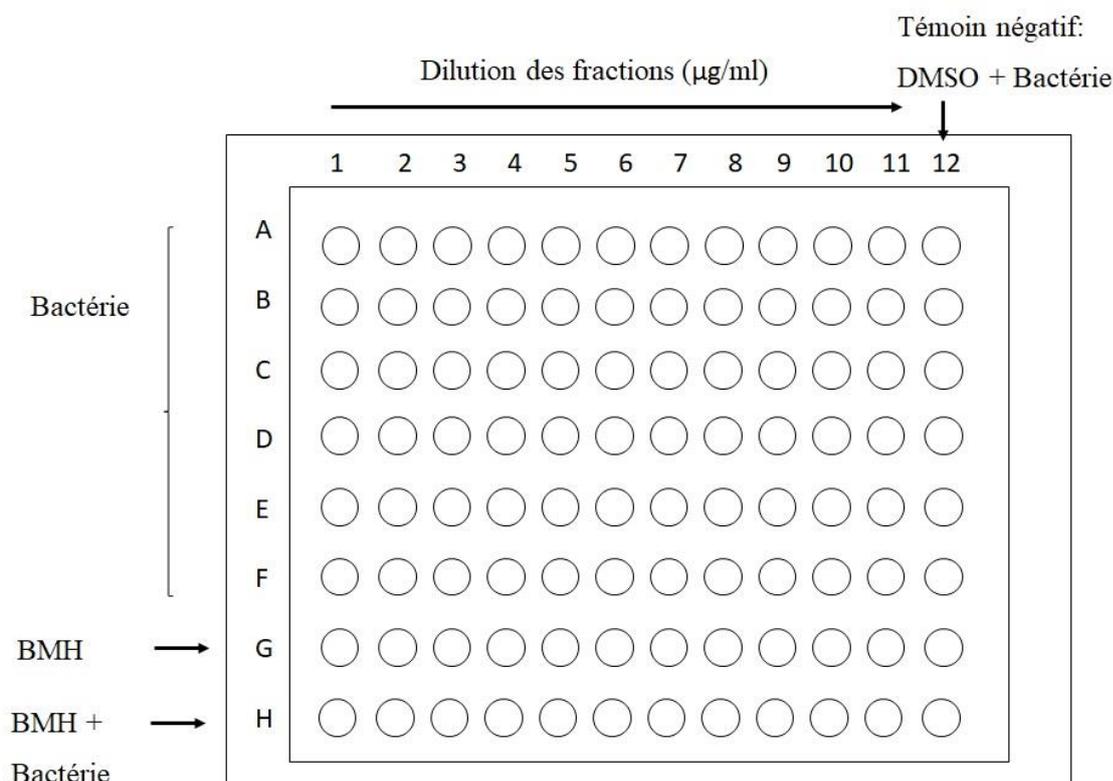


Figure 39. Schéma de la technique de micro-dilution.

2. 7. Fractionnement chromatographique

2. 7. 1. Chromatographie sur couche mince :

L'extrait dilué dans du dichlorométhane est déposé à l'aide d'un capillaire sur une plaque d'aluminium recouverte de silice. Le mélange est élué avec un mélange acétate d'éthyle/ cyclohexane 30/70 v/v. Après migration le solvant est évaporé au sèche-cheveux et la plaque révélée par UV puis avec un révélateur

2. 7. 2. Purification de l'extrait par chromatographie préparative sur couche mince (CCM)

L'extrait, dilué dans du dichlorométhane est déposé à l'aide d'un capillaire sur une plaque en verre (20 x 20 cm), à 1,5 cm du bord inférieur. Le dépôt est réalisé en bande mince et continue. La plaque est placée dans une cuve fermée, en contact avec la phase mobile d'acétate d'éthyle/ cyclohexane (30/70 ; v/v) (Figure 40). La chromatographie est arrêtée

lorsque la phase mobile (front du solvant) atteint 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. Le solvant est évaporé à l'aide d'un sèche-cheveux. Les substances séparées sont révélées par observation en lumière ultraviolette (longueur d'onde 254 et 360 nm). Les tâches sur la silice sont délimitées, grattées et solubilisées dans le cyclohexane. La silice éliminée par filtration, le solvant évaporé et la fraction pesée.

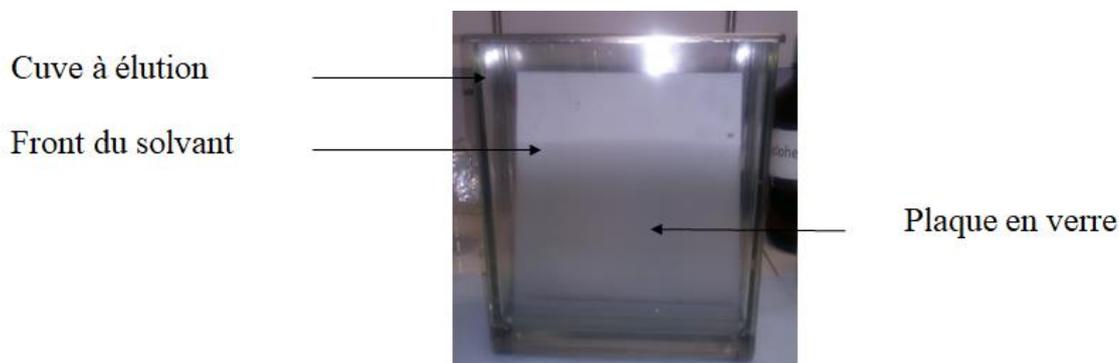


Figure 40. Chromatographie préparative sur couche mince (CCM)

- activité nulle ; + activité faible ; ++ activité importante ; +++ activité très importante

2. 7. 3. Fractionnement de l'extrait sur colonne de silice

Une colonne de 50 cm de longueur et de 1,5 cm de diamètre est utilisée. Un morceau de coton est placé au fond de la colonne. Ensuite, la colonne est remplie délicatement par 40 mL de gel de silice dans l'éther de pétrole. A la surface de la silice 3 g du produit à purifier (produit venant des étapes d'extraction) mélangé avec de la silice sont déposés.

L'élution est assurée par le gradient suivant :

- 100 % éther de pétrole
- Ether / éther de pétrole (10:90; v/v)
- Ether / éther de pétrole (20:80; v/v)
- Ether / éther de pétrole (30:70; v/v)
- Ether / éther de pétrole (40:60; v/v)
- Ether / éther de pétrole (50:50; v/v)
- 100 % Ether diéthylique
- 100 % Dichlorométhane
- 100 % Méthanol

Les différentes fractions recueillies sont concentrées au rotavapor puis chromatographiées sur couche mince (Merck 5716) afin d'en déterminer la pureté.

2. 8. Analyse par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

2. 8. 1. *Chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)*

Les fractions isolées sont analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'instrument de chez ThermoFisher Scientific est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (Focus) couplé à un spectromètre de masse quadrupolaire (DSQ2).

L'échantillon est solubilisé dans le dichlorométhane (10 mg/mL) et 1 μ L de cette solution est injecté en GC-MS. La séparation des composés en GC est réalisée sur une colonne capillaire ZB1 (Zebron) de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre et 0,25 microns d'épaisseur de phase. La température de l'injecteur est réglée à 250 °C, l'injection est faite en mode split avec un rapport de division 10/1. Après un isotherme de 10 minutes à 80 °C, la température de la colonne est programmée de 80 à 300 °C à 5 °C min⁻¹ et maintenue à 300 °C pendant 20 min. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 mL/min.

L'interface entre le GC et le spectromètre de masse est chauffée à 280 °C. L'ionisation en spectrométrie de masse se fait par impact électronique à 70 eV avec une température de source de 200 °C. L'acquisition est réalisée en mode full scan entre 50 et 600 unités de masse atomique avec une vitesse de balayage de 2 scans par seconde.

2. 8. 2. *Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)*

Les fractions isolées sont analysées par chromatographie liquide haute pression (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse. L'instrument est un LC-MS 2020 Shimadzu.

L'échantillon est solubilisé dans le méthanol (1 mg/mL) et 0.5 μ L est injecté en LCMS. La séparation des composés en LC est réalisée sur une colonne chromatographique de type Macherey Nagel NUCLEOSHELL RP 18 150 x 4.6 mm (i.d), 5 μ m (Ref : 763156.46), à une température de 40 °C et un débit de phase mobile de 1 mL/min selon le gradient de phase mobile suivant :

- Conditions initiales : Eau acidifiée avec 0.1 % d'acide formique / Acétonitrile 70/30 (%/%)
- Montée à 100 % d'acétonitrile en 15 min
- Plateau à 100 % d'acétonitrile pendant 5 min
- Retour aux conditions initiales en 0.10 min
- Plateau aux conditions initiales jusqu'à 25 min

Le temps d'acquisition est fixé à 25 min avec un mode de scan positif et négatif (ESI+ et ESI- sur le domaine de m/z). Les spectres de fragmentation sont acquis sur une gamme dynamique allant de 100 à 1800 m/z. La température d'interface est de 350°C, la température de Heat block est de 400 °C et la température de la ligne de désolvation est de 250°C. Le débit de gaz nébulisant est de 1,5 mL/min, le débit de désolvation est de 15 L/min.

2. 9. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Après évaporation du solvant sous vide, l'extrait est repris dans du chloroforme deutéré (CDCl₃). Les spectres RMN du proton sont enregistrés à 500 MHz sur un spectromètre Bruker Ultrashield équipé d'une cryoson d'azote Prodigy et d'un passeur d'échantillons. Le rapport gyromagnétique du carbone étant 4 fois moins élevé que celui du proton, les spectres du carbone sont enregistrés à 125 MHz sur le même aimant. Le contrôle de l'instrument : accord de la sonde à la fréquence d'excitation du noyau, compensation de la dérive du champ dans le temps grâce au lock sur le deutérium, compensation de l'hétérogénéité du champ magnétique, émission de l'impulsion de radiofréquence excitatrice, réception du signal de relaxation, amplification du signal sont assurés par une console néo. Le passeur d'échantillon est contrôlé par le logiciel IconNMR alors que l'acquisition et le traitement des données se font par le logiciel topspin 4.0.

3. Résultats et discussions

3. 1. Culture et extraction par les solvants organiques

L'extraction des métabolites secondaires de la souche *S. griseoflavus* EMM111 prédatrice est basée sur les résultats obtenus par le suivi de l'activité antibactérienne sur le milieu liquide, qui a montré que le maximum de la production est atteint après 15 jours d'incubation.

L'extraction par l'acétate d'éthyle a permis d'obtenir 2 phases : aqueuse et organique (Figure 41). L'étude de leurs activités antibactériennes a montré que les molécules à activité antibactérienne se trouvent au niveau de l'extrait acétate d'éthyle (Figure 42 et 43).

Après évaporation sous vide à 45 °C de 15 L de l'extrait organique, 3 g d'extrait brut de couleur rouge violet avec une texture huileuse sont obtenus, l'extrait brut est dissout dans 2 mL de l'acétate d'éthyle.

Au cours des étapes d'extraction et de purification, le suivi de l'activité antibactérienne de l'extrait et des fractions, a été conduit par l'étude de l'activité antibactérienne sur les mêmes

bactéries utilisées dans le chapitre 1. Le suivi de l'activité antibactérienne est nécessaire pour guider le processus de fractionnement et de purification de la ou les substances actives. Toutes les fractions sont évaluées, et celles qui possèdent une activité biologique sont soumises à des étapes de purification supplémentaires.

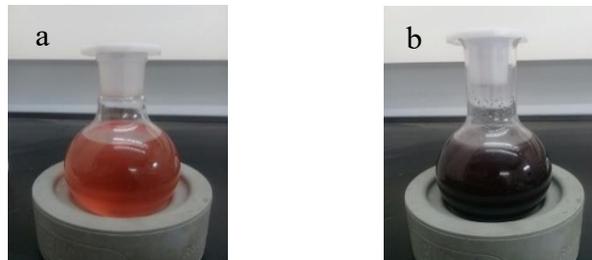


Figure 41. Différentes phases obtenues après extraction de la culture liquide de la souche EMM111 prédatrice par l'acétate d'éthyle. (a) Phase organique. (b) Phase aqueuse

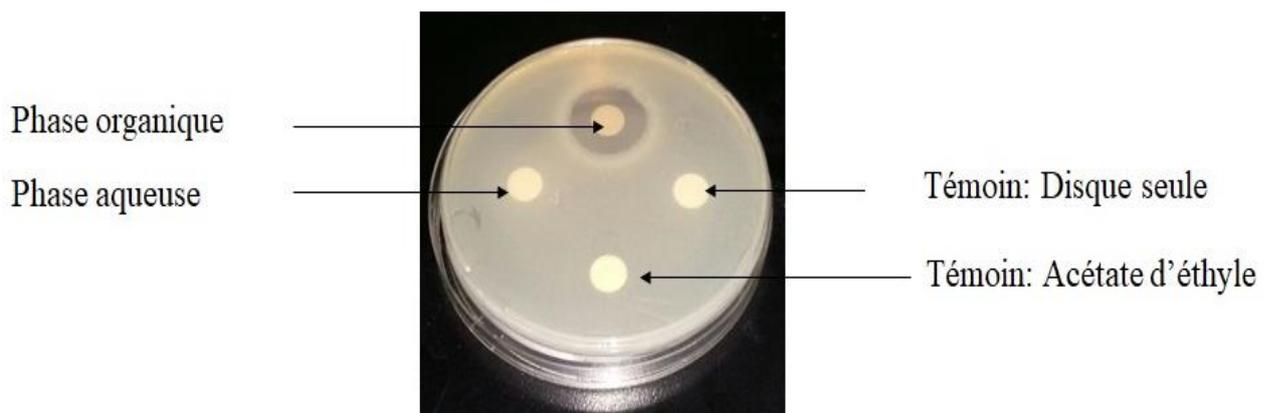


Figure 42. Activité antibactérienne des différentes phases obtenues après extraction de la culture liquide de la souche *S. griseoflavus* EMM111 par l'acétate d'éthyle vis-à-vis SARM

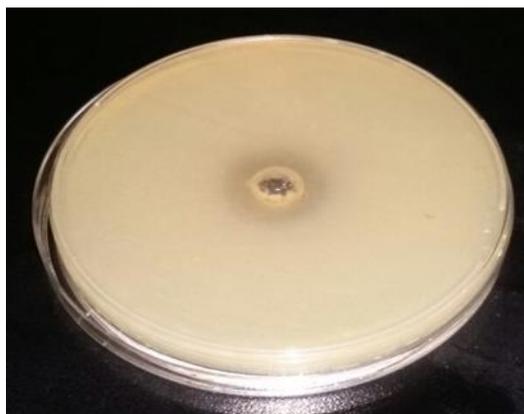


Figure 43. Activité antibactérienne de l'extrait de la souche *S. griseoflavus* EMM111 par l'acétate d'éthyle vis-à-vis SARM par la technique des puits

3. 2. Choix du système de solvant pour la chromatographie sur couche mince

- Pour le choix d'un système de solvants pour la chromatographie sur couche mince, des dépôts de l'extrait sont chromatographiés sous forme de spots dans 13 systèmes différents :
- Dichlorométhane/ Méthanol : (20 :80 ; v/v) ; (40 :60 ; v/v) ; (60 :40 ; v/v) et (70 :30 v/v) ; (80 :20/ v/v).
- Méthanol/ Ether de pétrole : (20 :80 ; v/v) ; (40 :60 ; v/v) ; (60 :40 ; v/v) ; (70 :30 ; v/v) et (80 :20/v/v) ;
- Acétate d'éthyle/ cyclohexane (20 :80 ; v/v) ; (30 :70 ; v/v) et (40 :60 ; v/v)

3. 3. Purification des fractions bioactives

3. 3. 1. Fractions peu polaires

La séparation des molécules responsables de l'activité antibactérienne, présentes dans l'extrait de culture d'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111, a été effectuée à l'aide de différentes méthodes de chromatographie (Figure 44). En effet, la phase organique est d'abord séparée par chromatographie préparative sur couche mince (CCM) avec un mélange acétate d'éthyle/ cyclohexane (30 :70 ; v/v) comme éluant. Une fraction bioactive (Fraction 4) (Tableau 21) est ainsi obtenue et analysée par GC-MS. Ensuite, le spectre de masse obtenu en impact électronique à 70 eV, est comparé avec la base de données spectrales Bibliothèque NIST (Figures 45 et 46). Ce qui a permis d'identifier un composé pur le di(2-ethylhexyl) phtalate DEHP. Cette suggestion est confirmée par la RMN (Figures 47 et 48).

Le composé identifié dans la fraction peu polaires est le di(2-ethylhexyl) phtalate (Figure 46). Il est couramment utilisé comme plastifiant pour améliorer la plasticité et la flexibilité des matériaux (Gao and Wen, 2016; Rivera-Utrilla et al., 2012). De plus, ce composé a des propriétés insecticides (Mayer and Ellersieck, 1986; Streufert, 1977). En effet, les actinobactéries constituent une source considérable de métabolites secondaires bioactifs, y compris les bio-insecticides (Berdy, 2005; Omura, 2011; Tanaka and Omura, 1993).

Le di(2-ethylhexyl) phtalate est un ester de l'acide phtalique (acide benzènedicarboxylique-1,2), un métabolite secondaire connu pour être produit par les champignons *Aspergillus awamori* (Lotfy et al., 2018), *Penicillium janthinellum* (El-Sayed et al., 2015), *Gibberella fujikuroi* (Cross et al., 1963), mais aussi par des actinobactéries notamment *Streptomyces avidinii* (SudhaSrikesavan and Selvam, 2012), *Streptomyces mirabilis* (El-Sayed, 2012), *Nocardia levis* (Kavitha et al., 2009). A notre connaissance, aucune publication ne rapporte la production de di(2-ethylhexyl) phtalate par la souche *Streptomyces griseoflavus*.

La fraction contenant le di(2-ethylhexyl) phthalate a montré une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries testées notamment la bactérie multirésistante SARM (Figure 49 et Tableau 22), ce qui a été confirmé par plusieurs auteurs (Belghit et al., 2015; Bharti and Tewari, 2015; El-Sayed, 2012; Ortiz and Sansinenea, 2018). Cependant, le di(2-ethylhexyl) phthalate n'a pas montré une activité vis-à-vis *E. coli* résistante.

Par ailleurs, en plus de son activité antibactérienne, plusieurs études ont signalé que le di(2-ethylhexyl) phthalate possède plusieurs autres activités, telles que l'activité antioxydante, antimutagènes, cytotoxique et anti-leucémiques (El-Sayed, 2012; Kavitha et al., 2009; Lee et al., 2000; Philip et al., 2011; Senthilkumar et al., 2011; Viju et al., 2019).

La CMI de la fraction de di(2-ethylhexyl) phtalate a été déterminée par la technique de microdilution. Le di(2-ethylhexyl) phtalate a une CMI allant de 3.75 à 15 µg/mL pour toutes les souches testées, sauf la bactérie multirésistante *E. coli* ou il possède une activité supérieure à 100 µg/mL (Tableau 22). Il est intéressant de noter que les valeurs CMI et CMB rapportées dans notre étude étaient inférieures aux autres valeurs rapportées pour le di(2-ethylhexyl) phtalate pour les bactéries testées sensibles (*M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli*) et SARM (Habib and Karim, 2009; Lotfy et al., 2018; Rajamanikyam et al., 2017).

Selon Traoré et al. (2012), lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance à activité antibactérienne est (≤ 4), la substance est considérée bactéricides. Dans notre cas, les valeurs

CMB/CMI calculées pour le di(2-ethylhexyl) phtalate sont inférieurs à 4. Donc, il a un effet bactéricide vis-à-vis *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli* (ATCC 8739) et SARM.

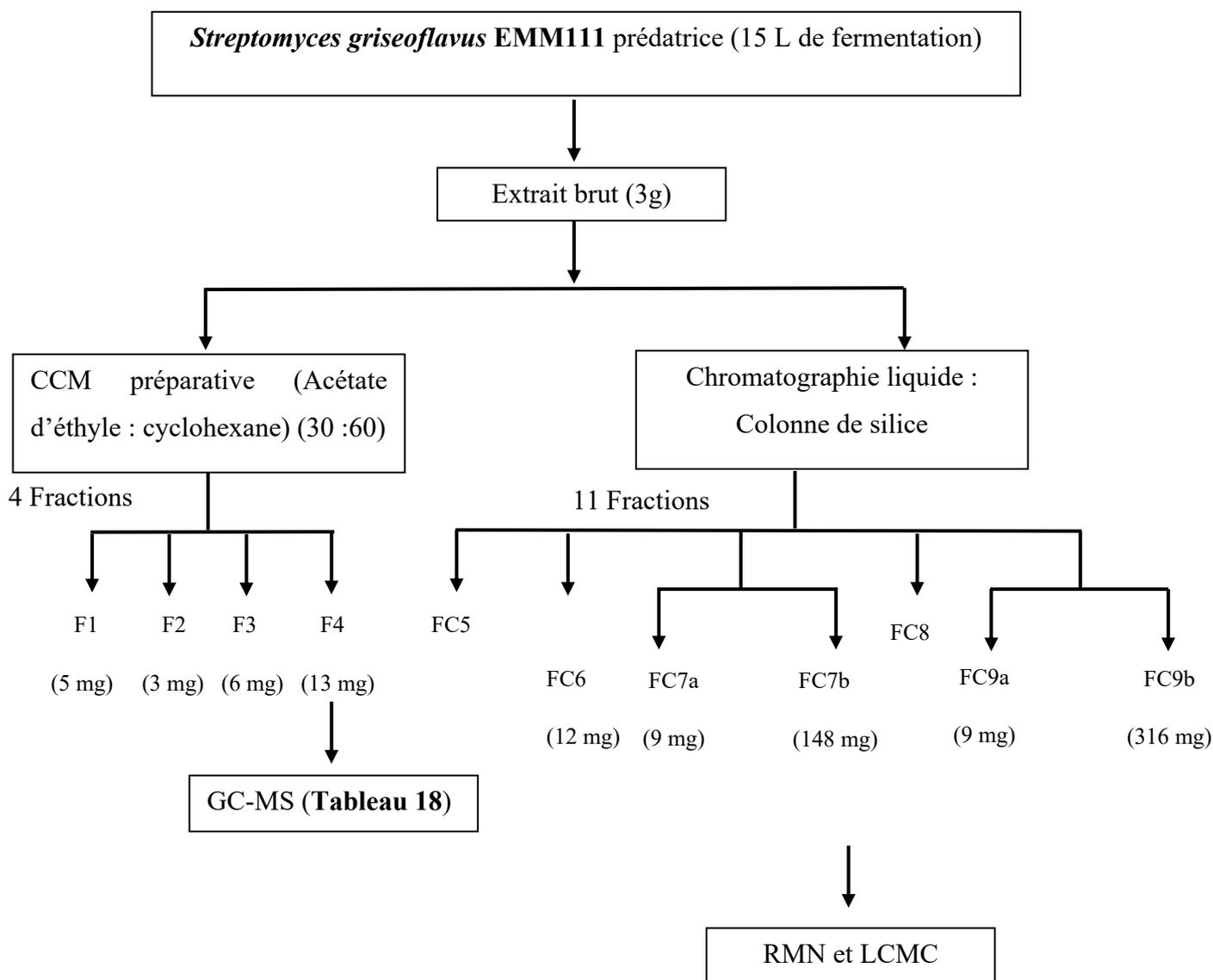


Figure 44. Protocole de séparation des fractions bio actives

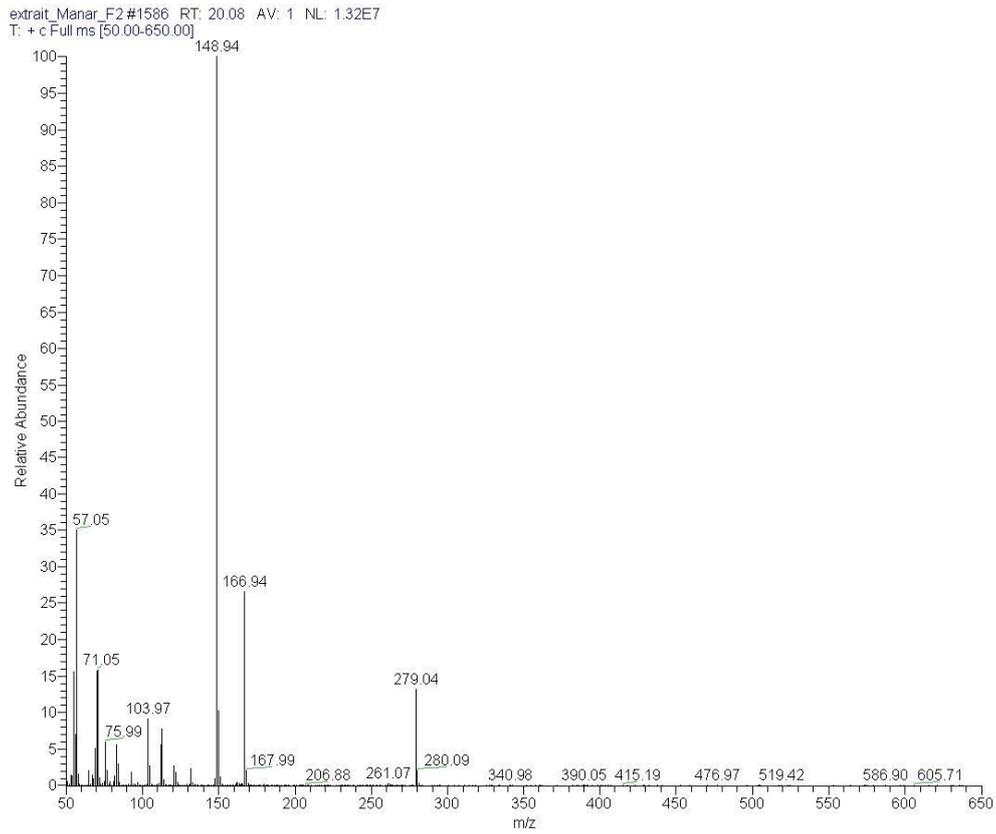


Figure 45. Spectre de masse de la fraction 4, impact électronique (70 eV)

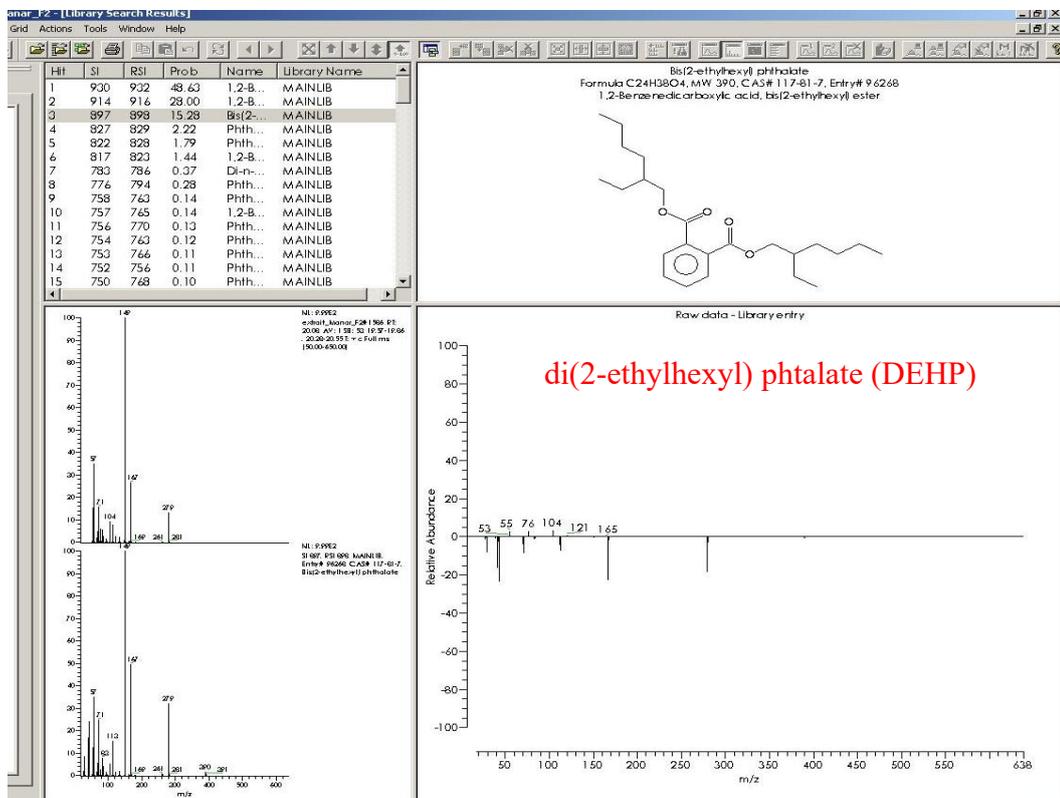


Figure 46. Bibliothèque NIST

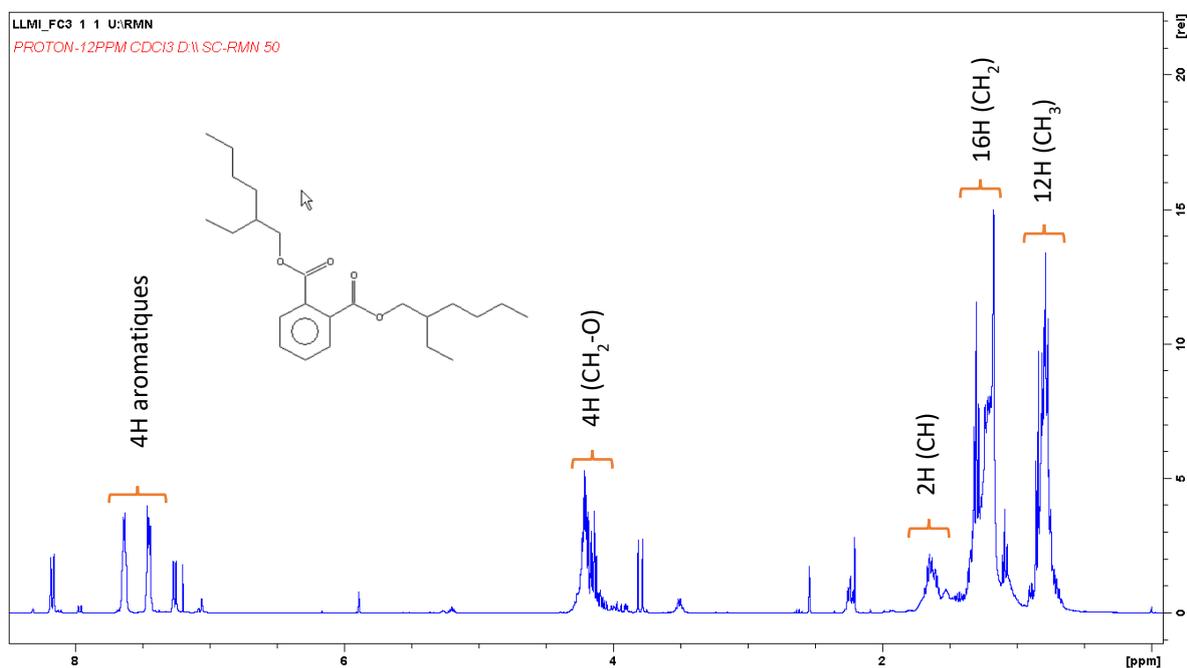


Figure 47. Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de la Fraction 4

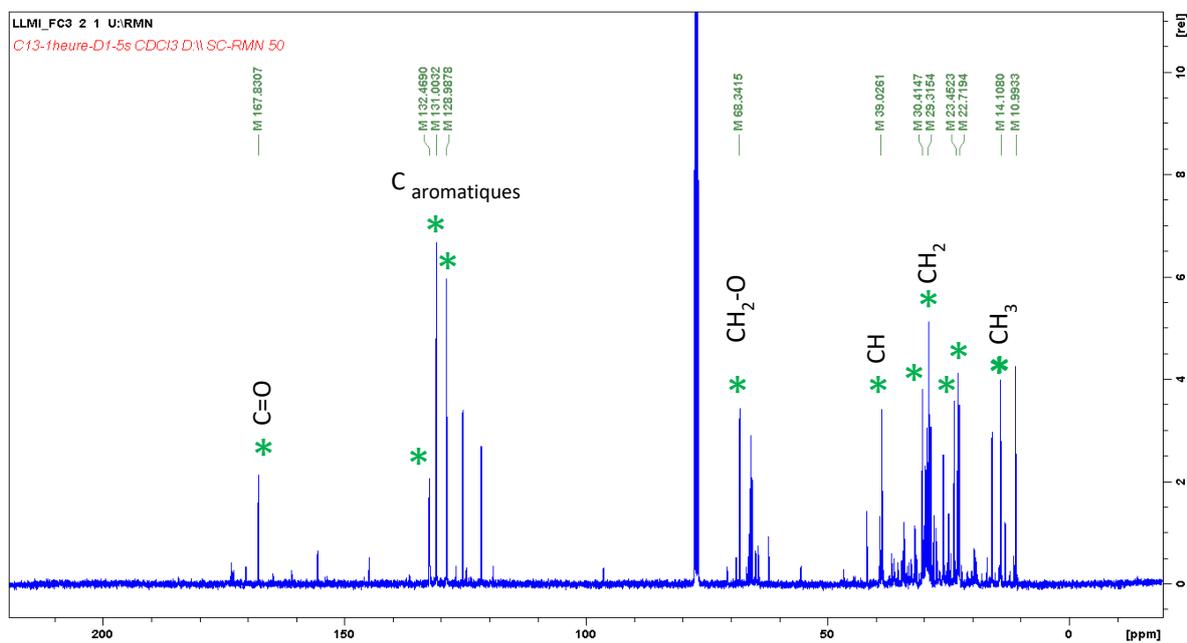


Figure 48. Spectre RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃) de la Fraction 4

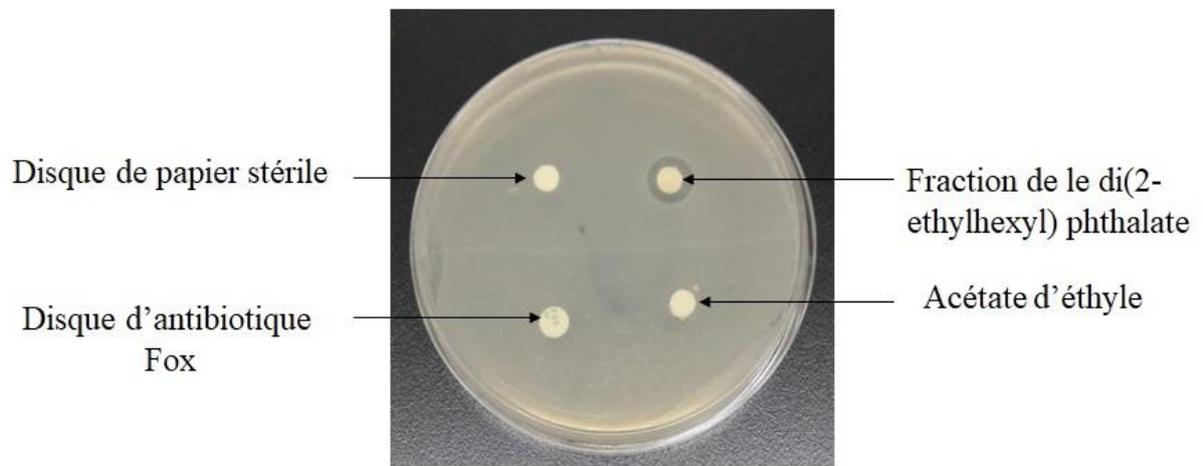


Figure 49. Activité antibactérienne de la fraction contenant le di(2-ethylhexyl) phthalate vis-à-vis SARM

Tableau 19. Résultats de l'activité antibactérienne des fractions purifiées vis-à-vis différentes bactéries

Fractions	Solvants	Activité des puits					Activité des disques					Nature de l'effet
		<i>M. luteus</i> (ATCC381)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	SARM (NCTC 12493)	<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>E. coli</i> Résistante (ATCC 35218)	<i>M. luteus</i> (ATCC381)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	SARM (NCTC 12493)	<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>E. coli</i> Résistante (ATCC 35218)	
F1	Éther de pétrole	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
F2	(Ether/ Éther de pétrole) (10/90)	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
F3	(Ether/ Éther de pétrole) (20/80)	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
F4	(Ether/ Éther de pétrole) (30/70)	++	++	++	+	-	++	++	++	+	-	Bactéricide
FC5	(Ether/ Éther de pétrole) (40/60)	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
FC6	(Ether/ Éther de pétrole) (50/50)	++	++	++	-	-	+	+	+	-	-	Bactéricide
FC7a	Ether	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
FC7b	Ether	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+	Bactéricide
FC8	Dichlorométhane	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
FC9a	Méthanol	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
FC9b	Méthanol	+++	+++	+++	-	-	++	++	++	-	-	Bactéricide

- activité nulle ; + activité faible ; ++ activité importante ; +++ activité très importante

Tableau 20. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentration minimales bactéricides (CMB) de la fraction di(2-ethylhexyl) phthalate

Bactéries	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMB/CMI
<i>M. luteus</i> (ATCC381)	3.75	7	1.86
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	7.5	15	2
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	7.5	15	2
SARM (NCTC 12493)	15	30	2
<i>E. coli</i> résistante (ATCC 35218)	>100	>100	-

3. 3. 2. Fractions polaires

Afin de séparer les composés polaires, voire très polaires, l'extrait a été fractionné sur colonne de silice avec un gradient d'éluion éther de pétrole (edp)/éther allant de 100 % edp à 100 % d'éther. Les fractions très polaires ont été éluées au dichlorométhane puis au méthanol. Treize fractions ont été obtenues (Figure 44, 50 et 51). Les caractéristiques des fractions majoritaires sont résumées dans le Tableau 23 :

Tableau 21. Caractéristique des fractions obtenues sur colonne de silice

fraction	F4	FC6	FC7a	FC7b	FC9a	FC9b
quantité	13 mg	12 mg	9 mg	148 mg	9 mg	316 mg
couleur	jaune	jaune	jaune	rouge	Rose	violette
Eluant	60/40	50/50		Ether		méthanol

L'activité antibactérienne des treize fractions de l'actinobactérie prédatrice *S. griseoflavus* EMM111 obtenues après séparation par colonne de silice a été évaluée par la technique des disques et de puits (Tableau 21). Les résultats ont montré que la FC7b et la FC9b ont une activité antibactérienne importante. Ces deux fractions ont fait l'objet d'une purification supplémentaire sur colonne de silice.

La fraction active FC7b est séparée en six fractions. La fraction majoritaire est FC7-3 (70 mg). Elle est ensuite séparée en trois fractions (Figure 50). La fraction majoritaire obtenue FC732 (56 mg) a été soumise à une étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricides (CMB).

La fraction FC732 est très active contre toutes les bactéries testées avec des valeurs de CMI variant de 0.2 µg/mL à 12.5 µg/mL, y compris les bactéries multirésistantes (Tableau 24). Le rapport CMB/CMI calculé pour la fraction FC732 est inférieur à 4 pour toutes les bactéries. Donc, il a un effet bactéricide. Les valeurs des CMI et CMBs calculées ont montré que la fraction CMB/CMI sont bactéricides sur les 5 bactéries testées (Le rapport CMB/CMI ≤ 4) (Traoré et *al.*, 2012).

La fraction active FC9b est séparée en cinq fractions (Figure 51). Toutes les fractions ont montré une activité. La fraction FC9b3 est la fraction qui a montré une bonne activité antibactérienne. Elle est active sur les bactéries à Gram négatif avec une CMI comprise entre 0.2 µg/mL et 0.4 µg/mL alors qu'elle présente une CMI supérieure 100 µg/mL sur *E. coli* et *E. coli* résistante (Tableau 25). Cette fraction a un effet bactéricide puisque le rapport CMB/CMI est inférieur à 4.

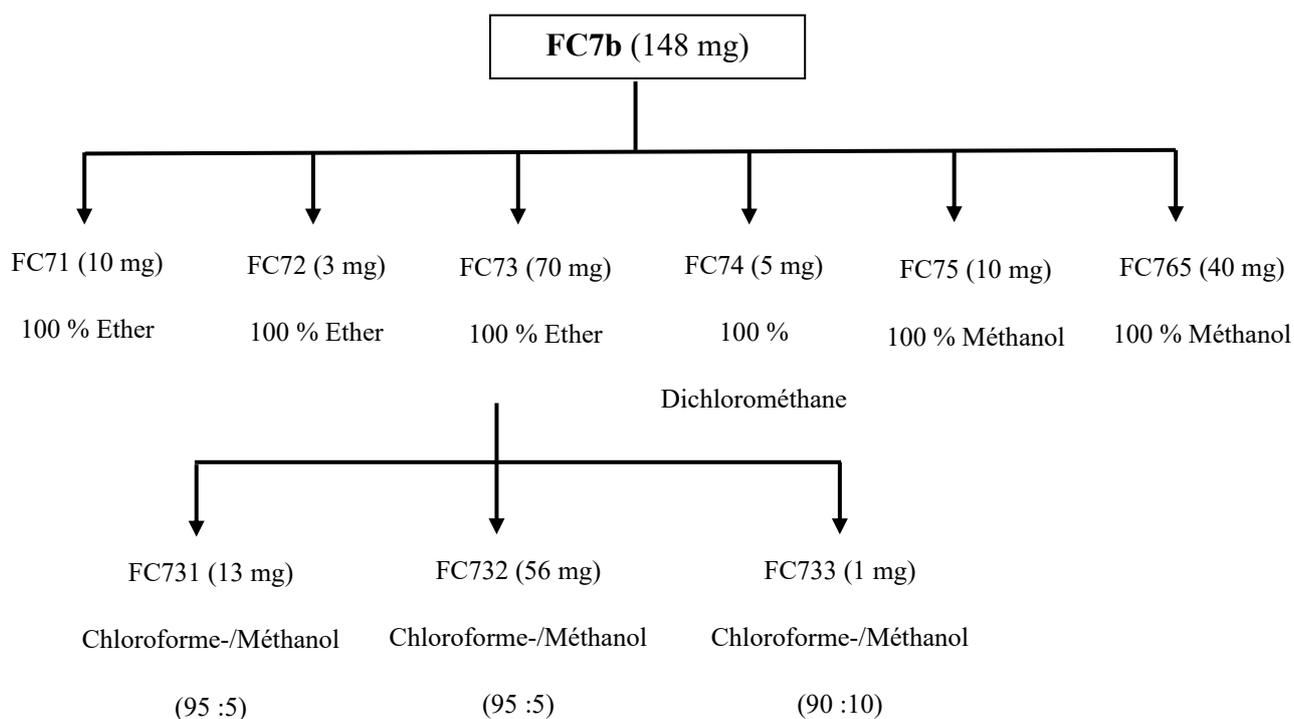


Figure 50. Protocole de séparation de la fraction bioactive FC7b

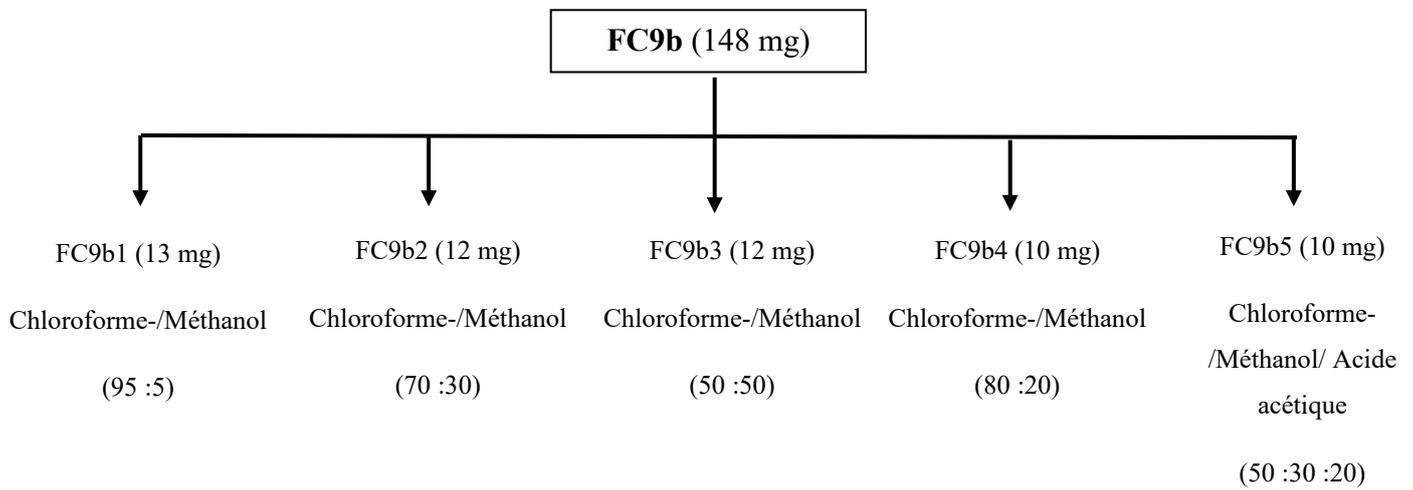


Figure 51. Protocole de séparation de la fraction bioactive FC9b

Tableau 22. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) de la fraction FC732

Bactéries	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)	CMB/CMI
<i>M. luteus</i> (ATCC381)	0.2	0.2	1
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0.4	0.8	2
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	3.2	6.4	2
SARM (NCTC 12493)	0.78	0.78	1
<i>E. coli</i> résistante (ATCC 35218)	12.5	12.5	1

Tableau 23. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Concentrations minimales bactéricides (CMB) de la fraction FC9b3

Bactéries	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)	CMB/CMI
<i>M. luteus</i> (ATCC381)	0.2	0.2	1
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0.2	0.78	0.39
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	>100	>100	-
SARM (NCTC 12493)	0.4	0.4	1
<i>E. coli</i> résistante (ATCC 35218)	>100	>100	-

Les fractions de FC6 à FC9 sont analysées par LC-MS et par résonance magnétique nucléaire (RMN) 1D proton, carbone (^{13}C , DEPT 90 et 135) et RMN 2D homonucléaire (COSY) et hétéronucléaire (HSQC).

La Figure 52 présente le chromatogramme de la fraction FC9b3. L'utilisation de la LC-MS permis d'identifier un composé. Les spectres obtenus en modes positif et négatif (Figure 35) indiquent une masse moléculaire de 304 uma. ESI⁺ : 287 [MH-H₂O]⁺, 305 [MH]⁺, 327 [MNa]⁺, 631 [2MNa]⁺; ESI⁻ : 303 [M-H]⁻, [2M-H]⁻. Nous avons comparé cette masse avec les molécules produites par *S. griseoflavus* dans la littérature (Tableau 26). Mais, aucun antibiotique n'a correspondu à notre molécule.

Les spectres RMN de la fraction FC732 sont très complexes et difficilement exploitables pour l'élucidation et la détermination de la structure de la molécule (Annexe 2).

Il a été démontré que plusieurs molécules antibactériennes ont été purifiées et caractérisés à partir de la souche *S. griseoflavus* dans la littérature (Tableau 26). Ces molécules sont produites par antibiose sur des milieux riches et possèdent une activité antibactérienne uniquement vis-à-vis les bactéries à Gram positif. Ce qui est en cohérence avec nos résultats obtenues par notre souche *S. griseoflavus* EMM111 dans le chapitre 1 dans l'activité antibactérienne sur milieu riche (Bennett).

En revanche, les fractions di(2-ethylhexyl) phtalate et FC732 isolées par prédation dans notre étude ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries Gram-, ce qui n'a jamais était reporté par les molécules isolées par *S. griseoflavus* (Tableau 33). Ceci, nous laisse à confirmer que les métabolites secondaires impliqués dans les deux activités sont différents. Par conséquent, la co-culture de l'actinobactérie avec une bactérie proie conduit à la production de composés qui ne sont pas produits en monoculture. Cette conclusion est en accord avec nombreuses études récentes (Abdelmohsen et al., 2015; Hoshino et al., 2015b; Sung et al., 2017; Ueda and Beppu, 2017).

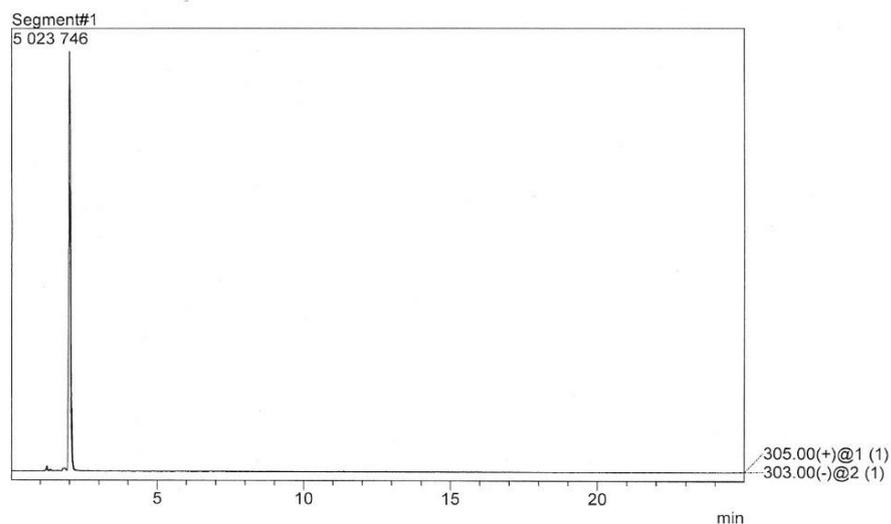


Figure 52. Chromatogramme (SIM 303 et 305) obtenu par couplage LCMS de la fraction FC9b3

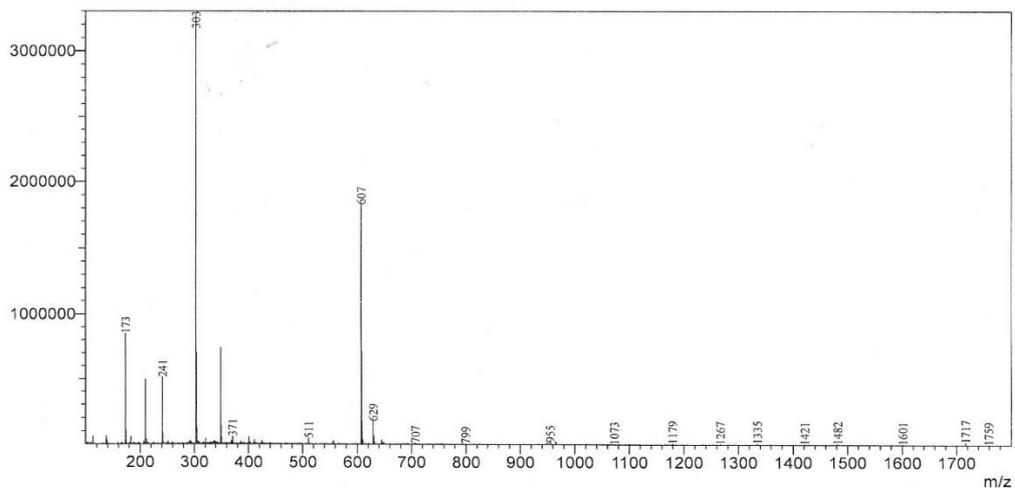
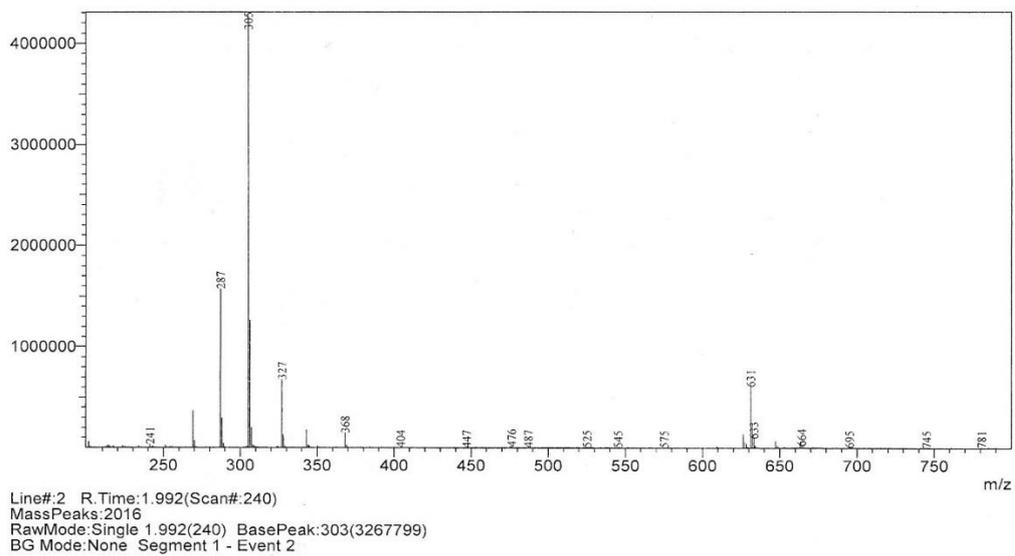


Figure 53. Spectres de masse obtenus par LCMS de la fraction FC9b3

Tableau 24. Antibiotiques produits par *Streptomyces griseoflavus*

Molécules	Couleur	Propriété chimique	Activité antibactérienne	Références
Streptovirudins C₃₀H₄₈N₄O₁₆ 720.7 g/mol	Blanc	-soluble dans le méthanol et la pyridine. -insoluble dans le chloroforme, l'acétone, le benzène et l'acétate d'éthyle.	-actif contre les bactéries Gram-positif. -inactif contre les bactéries Gram-négatif	(Eckardt et <i>al.</i> , 1975)
Okilactomycin C₂₄H₃₂O₆ 416.5 g/mol	Jaune	-soluble dans DMSO, ethanol, acétone, acetate d'éthyle et chloroforme. -insoluble dans l'eau	-faible activité contre les bactéries Gram-positif. -inactif contre les bactéries Gram-négatif	(Imai et <i>al.</i> , 1987)
Cetotetrine C₂₂H₂₁NO₇ 411.4 g/mol	Rouge orangé	-soluble dans le méthanol, l'éthanol, chloroforme et dichlorométhane. -insoluble dans l'hexane, éther de pétrole et l'eau.	-actif contre les bactéries Gram-positif.	(János et <i>al.</i> , 1971)
Colabomycine C₃₀H₃₀N₂O₇ 530.6 g/mol	Jaune	-soluble dans le N,N-diméthylformamide. -insoluble dans l'eau et les alcanes	-actif contre les bactéries Gram-positif.	(Grote et <i>al.</i> , 1988)

4. Conclusion

Les substances produites par l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111, après culture en milieux liquide, montrent une forte activité antibactérienne *vis-à-vis* les bactéries à Gram-positives.

L'extraction des produits bio-actifs a été réalisée par l'acétate d'éthyle. Ensuite, la séparation des molécules responsables de l'activité antibactérienne, présentes dans l'extrait a été effectuée à l'aide de différentes méthodes de chromatographie (chromatographie préparative sur couche mince, colonne de silice. L'analyse des fractions obtenues a été réalisées par GC-MS et LC-MS).

La CCM préparative a permis de séparer une fraction bioactive peu polaire qui est analysée par chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse (GCMS). La molécule est le di(2-ethylhexyl) phthalate. Ce dernier composé a présenté une activité bactéricide *vis-à-vis* la bactérie multirésistante SARM.

D'autres fraction très polaire avec une activité antibactérienne importante sont présentes dans l'extrait. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir des fractions pures à 100 % pour élucider leurs structures.

Conclusion générale

et

Perspectives

Les bactéries multirésistantes constituent un problème mondial majeure de santé publique. Ces bactéries ont accumulé des résistances à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutiques. La propagation de ces bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure. Devant, cette situation alarmante, il est impératif de chercher de nouvelles molécules antibactériennes efficaces avec un nouveau mode d'action.

Les actinobactéries sont les microorganismes les plus prolifiques en tant que productrices d'antibiotiques. Elles produisent les métabolites secondaires pour inhiber la croissance des autres microorganismes concurrents avec lesquels elles sont en compétition dans leur biotope. Il est avéré que les actinobactéries possèdent des gènes biosynthétiques responsables de la production de métabolites secondaires mais qui ne sont pas exprimés. La co-culture d'actinobactéries avec d'autres bactéries constitue une des voies de production de ces métabolites secondaires donc il est évident d'explorer la prédation comme une stratégie originale pour améliorer l'expression de nombreuses voies cryptiques présentes dans le génome des actinobactéries via leurs co-culture avec des bactéries proies.

Etant donné que la co-culture d'actinobactéries avec d'autres bactéries conduit à la production de composés qui ne sont pas produits en monoculture, il est logique de penser que la prédation pourrait être une stratégie originale pour améliorer l'expression des nombreuses voies cryptiques présentes dans le génome des actinobactéries via leur co-culture avec des bactéries proies.

La présente thèse s'inscrit dans ce contexte général et avait pour objectif la mise en évidence de la présence d'actinobactéries prédatrices facultatives capables de produire de nouveaux antibiotiques exclusifs à la prédation, comme un moyen de lutte contre les bactéries multirésistantes.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'isolement et au criblage des actinobactéries prédatrices facultatives à partir d'un habitat oligotrophe non encore bien exploré : les eaux marines de la côte Atlantique marocaine.

La technique de co-culture en présence de cellules lavées de *Micrococcus luteus* (proie) comme seule source de nutriments présente dans le milieu de culture a permis d'isoler cent quarante-deux souches à partir des eaux marines de sept stations ciblées (Sidi Ifni, Agadir, Cap Ghir, Essaouiria, Badouza, Lagune Oualidia et Sidi Bouzid).

Après purification, l'activité de prédation de chaque isolat a été étudié individuellement vis-à-vis *Micrococcus luteus*. Parmi les isolats, seuls quatre différentes actinobactéries prédatrices ont été sélectionnées. En se basant sur les critères suivants : une bonne croissance après 72-96h d'incubation, la consistance, la pigmentation du mycélium aérien et de substrat, l'observation microscopique et les caractéristiques spécifiques définies par le Projet International sur les *Streptomyces* (ISP).

Le mécanisme de prédation a été exploré vis-à-vis de *Micrococcus luteus* (ATCC381), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (NCTC 12493) et *Escherichia coli* (ATCC 35218). Les résultats obtenus montrent que les 4 isolats ont manifesté une activité de prédation vis-à-vis des 5 souches testées y compris les bactéries multirésistantes.

La recherche de l'activité antibactérienne des 4 isolats prédateurs EMM111, EMM112, EMM183 et EMM194 a été évaluée par la technique de cylindres d'agar en monoculture sur milieu riche Bennett vis-à-vis les mêmes bactéries utilisées dans le mécanisme de prédation. Les résultats obtenus montrent que les 4 isolats sont actifs sur au moins une des bactéries-tests.

L'étude de l'implication des substances diffusible dans l'activité de prédation des 4 isolats EMM111, EMM112, EMM183 et EMM194 a été investigué par l'étude de leur impact sur la survie et l'abondance de la proie. Les résultats obtenus indiquent que la croissance des 4 isolats prédateurs sélectionnés est concomitante à la diffusion de la ou des substances bactéricides.

La comparaison de l'activité de prédation (co-culture) et l'activité sur le milieu riche Bennett (monoculture) indique que les spectres d'activités sur les bactéries testées sont différents. Ce qui suggère que les métabolites secondaires impliqués dans les deux activités sont différents.

Dans le deuxième chapitre de ce travail, nous avons entrepris l'identification et la caractérisation morphologique, biochimique et moléculaire détaillées des 4 isolats prédateurs EMM111, EMM112, EMM183 et EMM194. Dans le but d'éviter la sélection de souches pathogènes d'une part et d'avoir une idée sur l'originalité des molécules impliquées dans les activités bactéricides observées. Autrement dit, les actinobactéries prédatrices sélectionnées sont-elles de nouvelles espèces ou des espèces connues prédatrices ?

L'étude taxonomique des actinobactéries s'est basée sur les éléments suivants :

- Les caractères morphologiques : couleur du mycélium de substrat, forme de la cellule et morphologie des hyphes...
- Les caractères cultureux : croissance, développement et pigmentation du mycélium aérien et du mycélium de substrat, présence de spores ainsi que de pigments diffusible dans le milieu de culture.
- Les caractères physiologiques : utilisation de substrats carbonés, production de pigment mélanoïde...
- Les caractères chimiotaxonomiques : nature de l'isomère de l'acide diamino-2-6-pimelique (DAP) constituant de la paroi cellulaire.
- L'identification moléculaire par le biais du séquençage du gène de l'ARNr 16S.

L'ensemble des caractères étudiés (morphologique, cultureux, physiologique, chimiotaxonomiques) a indiqué l'appartenance de EMM111, EMM112, EMM183 et EMM194 au genre *Streptomyces*.

L'identification des isolats prédateurs a été complétée par le séquençage partiel des gènes de l'ARNr 16S. En effet, la comparaison des séquences d'ARNr 16S de l'isolat EMM111 avec celles de la banque de données 'NCBI Blast' montre que cet isolat présente un pourcentage de similarité de 99 % avec la souche *Streptomyces griseoflavus*. L'isolat EMM112, présente 100 % de similarité avec l'espèce *Streptomyces coelicoflavus* tandis que l'isolat EMM138, a été identifié comme étant *Streptomyces mutabilis* avec un pourcentage de similarité de 100 %. Finalement l'isolat EMM149 a été identifié comme étant *Streptomyces champavatii* avec un pourcentage de similarité de 99 %. Nos isolats ont été identifiés pour la première fois comme étant des prédateurs.

La troisième partie de ce travail a été consacrée au suivi de l'interaction prédateur-proie par thermochemiolyse. L'étude a été effectuée selon deux étapes, une étape chimiotaxonomique portant sur la caractérisation de la proie (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (NCTC 12493)) et du prédateur (*Streptomyces griseoflavus* EMM111), via les acides gras membranaires libérés par la méthode pyrolytique et détectés sous forme d'esters méthyliques. La deuxième partie est basée sur le suivi des acides gras méthylés au cours de la co-culture du prédateur-proie pendant 2 semaines à 0, 8 et 15 jours.

La bactérie *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (NCTC 12493) présente une distribution dominée par les esters ramifiés (*iso* et *anteiso*) en C₁₅, avec un rapport *iso* sur *anteiso* de l'ordre de 0,4 et par les acides linéaires (C₁₈ et C₂₀) et une quantité totale d'acides gras de l'ordre de 17 mg/g. *Streptomyces griseoflavus* EMM111 est dominée par les composés ramifiés en C₁₄ et C₁₆, avec un rapport *iso* sur *anteiso* C₁₅ de l'ordre 0,9 et une quantité totale d'acides gras méthylés significativement plus élevée (83 mg/g).

Le suivi des acides gras au cours de la co-culture a permis de mettre en évidence la prédation à travers :

- L'augmentation de la quantité totale d'acides gras méthylés.
- Le changement drastique de la distribution des acides gras méthylés qui ressemble fortement à celle de l'actinobactérie prédatrice *Streptomyces griseoflavus* EMM111 après 15 jours de co-culture.
- La diminution des acides gras méthylés linéaires C₁₈ et C₂₀, caractéristiques de la proie SARM, entre T0 et T15.
- Les outils statistiques : l'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) ont confirmé la prédation de la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (NCTC 12493) par *Streptomyces griseoflavus* EMM111. L'ACP a permis de corrélérer les acides gras méthylés à longue chaîne (>C₁₈) avec SARM, alors que les composés ramifiés à chaînes courtes sont corrélés avec l'actinobactérie prédatrice EMM111 et T15. La CAH a permis d'établir une distinction entre la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (NCTC 12493) et *Streptomyces griseoflavus* EMM111, ainsi qu'une similitude entre *Streptomyces griseoflavus* EMM111 et T15.

Lors de cette étude, nous avons également validé l'utilisation de la thermochimolyse comme étant un outil chimiotaxonomique rapide et efficace pour (i) identifier les bactéries via les biomarqueurs tels que les acides gras méthylés et (ii) suivre leur devenir au cours d'une activité biologique telle que la prédation. De plus, nous avons mis en évidence la capacité des actinobactéries prédatrices à lutter contre les bactéries multirésistantes.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à l'extraction des molécules impliquées dans la prédation. Cette partie du travail constitue, à notre connaissance, la première tentative de recherche des molécules produites au cours de la prédation par la souche *Streptomyces griseoflavus* EMM111. Cet isolat a fait l'objet de plusieurs étapes de purification chimique et

d'élucidation structurale afin d'isoler des molécules à activité bactéricide. En effet, l'extrait brut de *Streptomyces griseoflavus* EMM111 a été séparé en 25 fractions dont les fractions FC3, FC732 et FC9b3 se sont révélées actives. La fraction 4 a permis l'identification du di(2-ethylhexyl) phthalate. Cette molécule possède des activités antibactériennes contre les Gram+, Gram – et la bactérie multirésistante *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (NCTC 12493). De plus, cette molécule n'a jamais été isolée par *Streptomyces griseoflavus*. Ce résultat confirme que cette molécule est produite exclusivement par prédation. La fraction FC732 est active contre les Gram+, Gram – et les bactéries multirésistantes. La fraction FC9b3 possède des activités antibactériennes contre les Gram +. La résonance magnétique nucléaire n'étant pas couplée à une méthode séparative, il n'est possible d'analyser qu'une fraction contenant une molécule pure ce qui n'était pas le cas de nos fractions malgré plusieurs chromatographies successives. Les spectres obtenus n'étaient de ce fait pas exploitables.

L'application des différentes étapes de screening, utilisées au cours de notre travail, a permis de trouver des souches d'actinobactéries prédatrices facultatives isolées à partir de l'eau marine marocaine capables d'utiliser les bactéries multirésistante comme proie. Ceci va constituer une nouvelle stratégie prometteuse pour combattre les bactéries multirésistantes.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats confirment l'intérêt des actinobactéries prédatrices d'origine marine dans la lutte contre les bactéries multirésistantes. Ils confirment la production par les actinobactéries des métabolites secondaires bactéricides lors de processus de prédation ce qui ouvre une nouvelle piste de recherche de nouveaux antibactériens.

En tenant compte de ces résultats, nous estimons que les aspects suivants méritent des études supplémentaires et un approfondissement :

- Continuer à explorer le et/ou les potentiels de prédation des actinobactéries vis-à-vis d'autres bactéries multirésistantes,
- Utiliser la microscopie électronique en transmission et les techniques de marquages (ex : immunofluorescence, ...) afin de monter et d'établir d'avantage les paramètres gérant le complexe actinobactéries-paroies,
- Approfondir et rechercher le et/ou les gènes impliqués dans la prédation,
- Optimiser les conditions de l'extraction et de la purification de l'extrait actif élaboré *Streptomyces griseoflavus* EMM111,
- Caractériser, par applications de différentes techniques spectroscopiques, les structures chimiques des deux fractions FC732 et FC9b3 purifiées à partir de

l'extrait de la souche de *Streptomyces griseoflavus* EMM111,

- Extraire, purifier et déterminer les structures des produits élaborés par les trois autres souches (*Streptomyces coelicoflavus* EMM112, *Streptomyces mutabilis* EMM183 et *Streptomyces champavatii* EMM149) retenues dans ce travail.

Références

bibliographiques

- Abdelmohsen, U.R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M.S., Quinn, R.J., Hentschel, U., 2015. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances* 33, 798–811.
- Abraham, E.P., Chain, E., 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146, 837.
- Abram, D., e Melo, J.C., Chou, D., 1974. Penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into host cells. *Journal of Bacteriology* 118, 663–680.
- Adnani, N., Chevrette, M.G., Adibhatla, S.N., Zhang, F., Yu, Q., Braun, D.R., Nelson, J., Simpkins, S.W., McDonald, B.R., Myers, C.L., 2017. Coculture of marine invertebrate-associated bacteria and interdisciplinary technologies enable biosynthesis and discovery of a new antibiotic, keyicin. *ACS Chemical Biology* 12, 3093–3102.
- Ainsworth, G.C., Brown, A.M., Brownlee, G., 1947. Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer. *Nature* 160, 878.
- Ait Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 1–43.
- Alonso, A.N., 2007. Cellulose degradation and biofilm formation in the developmental life cycle of the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. University of Massachusetts Amherst.
- Al-Zarban, S.S., Al-Musallam, A.A., Abbas, I., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R.M., 2002. *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 555–558.
- Amir, S., Abouelwafa, R., Meddich, A., Souabi, S., Winterton, P., Merlina, G., Revel, J.-C., Pinelli, E., Hafidi, M., 2010. PLFAs of the microbial communities in composting mixtures of agro-industry sludge with different proportions of household waste. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 614–621.
- Anibou, M., 2008. Les bactéries actinomycétales d’habitats marocains : screening de souches productrices de molécules a activite cytotoxique. Université Cadi Ayyad, Marrakech.
- Aouar, L., Lerat, S., Ouffroukh, A., Boulahrouf, A., Beaulieu, C., 2012. Taxonomic identification of rhizospheric *Actinobacteria* isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34, 165–176.
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., Spalla, C., 2000. Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering* 67, 704–713.
- Arul Jose, P., Jebakumar, S.R.D., 2013. Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00240>
- Asteris, M., Papailiopoulos, D., Kyrillidis, A., Dimakis, A.G., 2015. Sparse pca via bipartite matchings, in: *Advances in Neural Information Processing Systems*. pp. 766–774.
- Avorn, J.L., Barrett, J.F., Davey, P.G., McEwen, S.A., O’Brien, T.F., Levy, S.B., Response, W.H.O.D. of E. and P.A. and, Antibiotics, A. for the P.U. of, 2001. Antibiotic resistance : synthesis of recommendations by expert policy groups.
- Avril, J.L., 1992. *Bactériologie clinique*. Paris : ellipses, p. 511.
- Azimi, L., Alaghebandan, R., Asadian, M., Alinejad, F., Lari, A.R., 2019. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* circulation in a burn hospital, Tehran, Iran. *GMS Hygiene and Infection Control* 14.

- Badji, B., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N., 2006. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 373–382.
- Baer, M.L., Ravel, J., Chun, J., Hill, R.T., Williams, H.N., 2000. A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 219–224.
- Baig, U.I., Pund, A., Holkar, K., Watve, M., 2019. Predator prey and the third beneficiary. *bioRxiv* 730895.
- Baldacci, E., 1962. Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann. Soc. Belge Med. Trop* 4, 633–646.
- Baltz, R.H., 2019. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 46, 281–299.
- Banning, E.C., 2010. Biology and potential biogeochemical impacts of novel predatory *flavobacteria*. DTIC Document.
- Barbier, F., Wolff, M., 2010. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*-Vers l'impasse thérapeutique ? *médecine/sciences* 26, 960–968.
- Baser, K.H.C., Buchbauer, G., 2010. Essential oils science, technology, and applications. Florida, Estados Unidos: CRC Press. doi 10, 9781420063165–c3.
- Battraud, P., 2017. La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité? (PhD Thesis). Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lille 2
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A., 1965. Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 13, 236–243.
- Be'Er, A., Zhang, H.P., Florin, E.-L., Payne, S.M., Ben-Jacob, E., Swinney, H.L., 2009. Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 428–433.
- Beites, T., Oliveira, P., Rioseras, B., Pires, S.D., Oliveira, R., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P., Manteca, A., Mendes, M.V., 2015. *Streptomyces natalensis* programmed cell death and morphological differentiation are dependent on oxidative stress. *Scientific Reports* 5, 12887.
- Belghit, S., Bijani, C., Zitouni, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Badji, B., 2015. A new *Streptomyces* strain isolated from Saharan soil produces di-(2-ethylhexyl) phthalate, a metabolite active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology* 65, 1341–1350.
- 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, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.03.001>
- Belyagoubi, L., 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens (PhD Thesis).
- Benameur, Q., Gervasi, T., Pellizzeri, V., Pl'uchtová, M., Tali-Maama, H., Assaous, F., Guettou, B., Rahal, K., Grul'ová, D., Dugo, G., 2019. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla ESBL producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. *Natural Product Research* 33, 2647–2654.
- Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics* 58, 1.

- Bergh, Ø., Børshem, K.Y., Bratbak, G., Haldal, M., 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340, 467–468.
- Berleman, J.E., Kirby, J.R., 2009. Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiol Rev* 33, 942–957. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00185.x>
- Bharti, P., Tewari, R., 2015. Purification and structural characterization of a phthalate antibiotic from *Burkholderia gladioli* OR1 effective against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences* 5.
- Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R., Zeeck, A., 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 3, 619–627.
- Boubou, M., 2007. Contribution aux méthodes de classification non supervisée via des approches prétopologiques et d'agrégation d'opinions (PhD Thesis).
- Boudjella, H., 2007. Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens (PhD Thesis). INA.
- Bourlioux, P., 2013. De quelles alternatives notre arsenal thérapeutique anti-infectieux dispose-t-il face aux bactéries multi-résistantes? In: *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Elsevier, pp. 150–158.
- Bourlot, V.L., Tully, T., Claessen, D., 2015. Interference versus Exploitative Competition in the Regulation of Size-Structured Populations. *The American Naturalist*. <https://doi.org/10.1086/678083>
- Breton, A., 2019. La phagothérapie orale.
- Breton, A., Theilleux, J., 1989. Organismes producteurs: biologie, taxonomie et ecologie. Di dalam: Larpent JP, Sanglier JJ. *Biotechnologie des antibiotiques* 33–70.
- Brian, P.W., Curtis, P.J., Hemming, H.G., Norris, G.L.F., 1957. Wortmannin, an antibiotic produced by *Penicillium wortmanni*. *Transactions of the British Mycological Society* 40, 365–IN3.
- Brodie, E.D., 1999. Predator-Prey Arms Races Asymmetrical selection on predators and prey may be reduced when prey are dangerous. *Bioscience* 49, 557–568.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3, 238.
- Broomfield, A., Simões, M.F., 2019. *Penicillium* spp. strains as a possible weapon to fight microbial infections. *Access Microbiology* 1.
- Bull, A.T., Stach, J.E., 2007. Marine *Actinobacteria*: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology* 15, 491–499.
- Burnham, J.C., Hashimoto, T., Conti, S.F., 1968. Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into gram-negative bacterial hosts. *Journal of Bacteriology* 96, 1366–1381.
- Cain, C.C., Lee, D., Waldo, R.H., Henry, A.T., Casida, E.J., Wani, M.C., Wall, M.E., Oberlies, N.H., Falkinham, J.O., 2003. Synergistic Antimicrobial Activity of Metabolites Produced by a Nonobligate Bacterial Predator. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2113–2117. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2113-2117.2003>
- Cannell, R.J., 1998. *Natural products isolation*. Springer Science & Business Media.
- Casida Jr, L.E., 1982. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 32, 339–345.
- Casida, L.E., 1992. Competitive ability and survival in soil of *Pseudomonas* strain 679-2, a dominant, nonobligate bacterial predator of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 32–37.
- Casida, L.E., 1988. Minireview: nonobligate bacterial predation of bacteria in soil. *Microbial Ecology* 15, 1–8.
- Casida, L.E., 1983. Interaction of *Agromyces ramosus* with other bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 881–888.

- Casida, L.E., 1980. Bacterial predators of *Micrococcus luteus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 1035–1041.
- Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 19, 56–66.
- Castillo, U., Myers, S., Browne, L., Strobel, G., Hess, W.M., Hanks, J., Reay, D., 2005. Scanning electron microscopy of some endophytic *streptomycetes* in snakevine-*Kennedia nigricans*. *Scanning* 27, 305–311.
- Chafik, A., Cheggour, M., Cossa, D., Sifeddine, S.B.M., 2001. Quality of Moroccan Atlantic coastal waters: water monitoring and mussel watching. *Aquatic Living Resources* 14, 239–249.
- Chang, X., Nie, F., Yang, Y., Zhang, C., Huang, H., 2016. Convex sparse PCA for unsupervised feature learning. *ACM Transactions on Knowledge Discovery from Data (TKDD)* 11, 1–16.
- Chater, K., 1999. David Hopwood and the emergence of *Streptomyces* genetics. *International Microbiology* 2, 61–68.
- Chaussade, H., Sunder, S., Bernard, L., Coloby, P., Guy, L., Karsenty, G., Bastide, C., Bruyère, F., 2013. Les médicaments antibiotiques en urologie. *Progrès en Urologie, Rapport AFU 2013. Le médicament en urologie* 23, 1327–1341. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2013.09.001>
- Chen, H., Young, S., Berhane, T.-K., Williams, H.N., 2012. Predatory *Bacteriovorax* communities ordered by various prey species. *PLoS One* 7, e34174.
- Chernyakovskaya, T.F., Dobrovol'skaya, T.G., Bab'eva, I.P., 2004. The ability of saprotrophic bacteria isolated from natural habitats to lyse yeasts. *Microbiology* 73, 482–484.
- Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., Francou, F.-X., Fourier, C., Guérineau, M., Decaris, B., 2006. Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 23, 2361–2369.
- Claverías, F., Gonzales-Siles, L., Salvà-Serra, F., Inganäs, E., Molin, K., Cumsille, A., Undabarrena, A., Couve, E., Moore, E.R., Tindall, B.J., 2019. *Corynebacterium alimapuense* sp. nov., an obligate marine actinomycete isolated from sediment of Valparaíso bay, Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69, 783–790.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, J.M., Hatcher, P.G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 23, 169–175. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(94\)00109-E](https://doi.org/10.1016/0146-6380(94)00109-E)
- Coates, A.R.M., Halls, G., Hu, Y., 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br. J. Pharmacol.* 163, 184–194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x>
- Collard, M., Teychené, B., Lemée, L., 2015. Improved quantitative analysis of molecular constituents of wastewater sludge pellets using double-shot thermochemolysis-GCMS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 114, 265–272.
- Colombié, V., 2005. Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel (PhD Thesis). Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Cook, R.J., Baker, K.F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society.
- Cortina, N.S., Krug, D., Plaza, A., Revermann, O., Müller, R., 2012. Myxoprincomide: A Natural Product from *Myxococcus xanthus* Discovered by Comprehensive Analysis of

- the Secondary Metabolome. *Angewandte Chemie International Edition* 51, 811–816. <https://doi.org/10.1002/anie.201106305>
- Cosgrove, S.E., Sakoulas, G., Perencevich, E.N., Schwaber, M.J., Karchmer, A.W., Carmeli, Y., 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 36, 53–59.
- Couillerot, O., Loqman, S., Toribio, A., Hubert, J., Gandner, L., Nuzillard, J.-M., Ouhdouch, Y., Clément, C., Barka, E.A., Renault, J.-H., 2014. Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B* 944, 30–34.
- Courvalin, P., 2008. La résistance des bactéries aux antibiotiques: Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Cox, P.W., Paul, G.C., Thomas, C.R., 1998. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology* 144, 817–827.
- Cross, B.E., Galt, R.H.B., Hanson, J.R., Curtis, P.J., Grove, J.F., Morrison, A., 1963. 545. New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part II. The isolation of fourteen new metabolites. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 2937–2943.
- Cummins, C.S., Harris, H., 1958. Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. *Microbiology* 18, 173–189
- Cundliffe, E., 2006. Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 500.
- Curds, C.R., 1982. The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes. *Annual Reviews in Microbiology* 36, 27–28.
- Curl, E.A., Truelove, B., 1986. Microbial interactions, in: *The Rhizosphere*. Springer, pp. 140–166.
- Cwala, Z., Igbinsosa, E.O., Okoh, A.I., 2011. Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5, 118–124.
- Das, S., Lyla, P.S., Khan, S.A., 2008. Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 26, 166–177.
- Davidov, Y., Huchon, D., Koval, S.F., Jurkevitch, E., 2006. A new α -proteobacterial clade of *Bdellovibrio*-like predators: implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environmental Microbiology* 8, 2179–2188.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433.
- De Juan, A., Rutan, S.C., Maeder, M., Tauler, R., 2009. *Comprehensive Chemometrics*. Elsevier, Amsterdam.
- De Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., de Araújo, J.M., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16, 466–471.
- Delmotte, A., 1958. L'activité lipolytique microbienne décelée par la méthode de Sierra avec référence spéciale au *M. pyogenes* var. *aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 24, 309–320.
- Demain, A.L., Solomon, N.A., 1985. *Biology of industrial microorganisms*. Biotechnology series. Benjamin/Cummings, Redwood City, CA.
- Derewacz, D.K., Covington, B.C., McLean, J.A., Bachmann, B.O., 2015. Mapping microbial response metabolomes for induced natural product discovery. *ACS Chemical Biology* 10, 1998–2006.

- Dhanasekaran, D., Jiang, Y., 2016. *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. BoD–Books on Demand.
- Djinni, I., Defant, A., Kecha, M., Mancini, I., 2019. *Actinobacteria* Derived from Algerian Ecosystems as a Prominent Source of Antimicrobial Molecules. *Antibiotics* 8, 172.
- Dommergues, Y., Mangenot, F., 1970. *Ecologie microbienne du sol*. Masson.
- Druga, B., Suteu, D., Rosca-Casian, O., Parvu, M., Dragos, N., 2011. Two novel Alliin lyase (alliinase) genes from twisted-leaf garlic (*Allium obliquum*) and mountain garlic (*Allium senescens* ssp. *montanum*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39, 293.
- Dublanchet, A., 2014. Qu'est-ce que la phagothérapie? HEGEL.
- Dworkin, M., 1996. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological Reviews* 60, 70.
- Earl, D.C., Ferrell, P.B., Leelatian, N., Froese, J.T., Reisman, B.J., Irish, J.M., Bachmann, B.O., 2018. Discovery of human cell selective effector molecules using single cell multiplexed activity metabolomics. *Nature Communications* 9, 39.
- Eckardt, K., Thrum, H., Bradler, G., Tonew, E., Tonew, M., 1975. Streptoviridins, new antibiotics with antibacterial and antiviral activity. *The Journal of Antibiotics* 28, 274–279.
- El Fels, L., El Ouaquoudi, F.Z., Lemée, L., Winterton, P., Merlina, G., Ouhdouch, Y., Pinelli, E., Ambles, A., Hafidi, M., 2015. Identification and assay of microbial fatty acids during co-composting of active sewage sludge with palm waste by TMAH-thermochemolysis coupled with GC-MS. *Chemistry and Ecology* 31, 64–76.
- El-Sayed, M.H., 2012. Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from the culture filtrate of newly isolated soil *Streptomyces* (*Streptomyces mirabilis* strain NSQu-25). *World Applied Sciences Journal* 20, 1202–1212.
- El-Sayed, O.H., Asker, M.M., Shash, S.M., Hamed, S.R., 2015. Isolation, Structure elucidation and Biological Activity of Di-(2-ethylhexyl) phthalate Produced by *Penicillium janthinellum* 62. *Int J ChemTech Res* 8, 58–66.
- Ensign, J.C., Normand, P., Burden, J.P., Yallop, C.A., 1993. Physiology of some actinomycete genera. *Research in Microbiology* 144, 657–660.
- Escalante-Réndiz, D., de-la-Rosa-García, S., Tapia-Tussell, R., Martín, J., Reyes, F., Vicente, F., Gamboa-Angulo, M., 2019. Molecular Identification of Selected *Streptomyces* Strains Isolated from Mexican Tropical Soils and their Anti-Candida Activity. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16, 1913.
- Etzbach, L., Plaza, A., Garcia, R., Baumann, S., Müller, R., 2014. Cystomanamides: Structure and Biosynthetic Pathway of a Family of Glycosylated Lipopeptides from Myxobacteria. *Org. Lett.* 16, 2414–2417. <https://doi.org/10.1021/ol500779s>
- Ewald, P.W., 1987. Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503, 295–306.
- Fehr, T., King, H.D., Kuhn, M., 1977. Mutalomycin, a new polyether antibiotic taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* 30, 903–907. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.30.903>
- Fehr, T., Kuhn, M., Loosli, H.-R., Ponelle, M., Boelsterli, J.J., Walkinshaw, M.D., 1989. 2-epimutalomycin and 28-epimutalomycin, two new polyether antibiotics from *Streptomyces mutabilis*. *J. Antibiot.* 42, 897–902. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.42.897>
- Felder, S., Kehraus, S., Neu, E., Bierbaum, G., Schäberle, T.F., König, G.M., 2013. Salimyxins and Enhygrolides: Antibiotic, Sponge-Related Metabolites from the Obligate Marine Myxobacterium *Enhygromyxa salina*. *ChemBioChem* 14, 1363–1371. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300268>

- Fenical, W., Jensen, P.R., 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology* 2, 666.
- Ferguson, S.J., 1990. Periplasm underestimated. *Trends Biochem. Sci.* 15, 377.
- Ferguson, S.J., Mohan, S., Dow, C., Cole, J.A., 1992. The periplasm. Cambridge University Press, New York, NY(USA). 1992.
- Finke, D.L., Denno, R.F., 2004. Predator diversity dampens trophic cascades. *Nature* 429, 407–410.
- Flärdh, K., 2010. Cell polarity and the control of apical growth in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* 13, 758–765.
- Fournier, P.E., Richet, H., Weinstein, R.A., 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infectious Diseases* 42, 692–699.
- Fratamico, P.M., Cooke, P.H., 1996. Isolation of *Bdellovibrios* that prey on *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces1. *Journal of Food Safety* 16, 161–173.
- Fujimoto, H., Kinoshita, T., Suzuki, H., Umezawa, H., 1970. Studies on the mode of action of althiomycin. *The Journal of Antibiotics* 23, 271–275.
- Furusawa, G., Yoshikawa, T., Yasuda, A., Sakata, T., 2003. Algicidal activity and gliding motility of *Saprospira* sp. SS98-5. *Canadian Journal of Microbiology* 49, 92–100.
- Gadisa, E., Weldearegay, G., Desta, K., Tsegaye, G., Hailu, S., Jote, K., Takele, A., 2019. Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19, 24.
- Gago, G., Diacovich, L., Arabolaza, A., Tsai, S.-C., Gramajo, H., 2011. Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 35, 475–497.
- Gao, D.-W., Wen, Z.-D., 2016. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment* 541, 986–1001.
- García-Garmendia, J.-L., Ortiz-Leyba, C., Garnacho-Montero, J., Jiménez-Jiménez, F.-J., Pérez-Paredes, C., Barrero-Almodóvar, A.E., Miner, M.G., 2001. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clinical Infectious Diseases* 33, 939–946.
- Geitani, R., Ayoub Moubareck, C., Touqui, L., Karam Sarkis, D., 2019. Cationic antimicrobial peptides: alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* 19, 54. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1416-8>
- Geng, P., Bai, G., 2008. Two novel amino oligosaccharides isolated from the culture of *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 as potent inhibitors of α -amylase. *Carbohydrate Research* 343, 470–476.
- Germida, J.J., Casida, L.E., 1983. *Ensifer adhaerens* predatory activity against other bacteria in soil, as monitored by indirect phage analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 1380–1388.
- Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H., Trowitzsch, W., 1982. The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (Myxobacterales). *The Journal of Antibiotics* 35, 1454–1459.
- Gerth, K., Jansen, R., Reifensahl, G., Höfle, G., Irschik, H., Kunze, B., Reichenbach, H., Thierbach, G., 1983. The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales). *The Journal of antibiotics* 36, 1150–1156.

- Ghanem, N.B., Sabry, S.A., El-Sherif, Z.M., El-Ela, G.A.A., 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *The Journal of General and Applied Microbiology* 46, 105–111.
- Giansante, L., Di Vincenzo, D., Bianchi, G., 2003. Classification of monovarietal Italian olive oils by unsupervised (PCA) and supervised (LDA) chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 905–911.
- Gonzalez, J.M., Sherr, E.B., Sherr, B.F., 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 583–589.
- Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1985. *Chemical methods in bacterial systematics*. Academic Press.
- Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Sneath, P.H.A., 1993. *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press London.
- Goodfellow, M., Williams, S.T., 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37, 189–216.
- Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handerhan, J.E., Pang, C.H.-N., 1974. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 24, 54–63.
- Gordon, R.E., Mihm, J.M., 1957. A comparative study of some strains received as *nocardiae*. *Journal of Bacteriology* 73, 15.
- Gottlieb, D., 1973. General consideration and implications of the Actinomycetales, in: *Symp Ser Soc Appl Bacteriol*.
- Granato, D., Santos, J.S., Escher, G.B., Ferreira, B.L., Maggio, R.M., 2018. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science & Technology* 72, 83–90.
- Grote, R., Zeeck, A., Drautz, H., Zähler, H., 1988. Metabolic products of microorganisms. 244 Colabomycins, new antibiotics of the manumycin group from *Streptomyces griseoflavus*. *J. Antibiot.* 41, 1178–1185. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.41.1178>
- Guerrero, R., Pedrós-Alió, C., Esteve, I., Mas, J., Chase, D., Margulis, L., 1986. Predatory prokaryotes: Predation and primary consumption evolved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2138–2142.
- Guiral, E., Quiles, M.G., Muñoz, L., Moreno-Morales, J., Alejo-Cancho, I., Salvador, P., Alvarez-Martinez, M.J., Marco, F., Vila, J., 2019. Emergence of Resistance to Quinolones and β -Lactam Antibiotics in Enteroaggregative and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Causing Traveler's Diarrhea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63, e01745-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01745-18>
- Gumbo, J.R., Ross, G., Cloete, T.E., 2010. The isolation and identification of predatory bacteria from a *Microcystis* algal bloom. *African Journal of Biotechnology* 9.
- Habib, M.R., Karim, M.R., 2009. Antimicrobial and cytotoxic activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate and anhydrosophoradiol-3-acetate isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) flower. *Mycobiology* 37, 31–36.
- Hale, J.D., Hancock, R.E., 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 5, 951–959.
- Hamedi, J., Kafshnouchi, M., Ranjbaran, M., 2019. A Study on actinobacterial diversity of Hampoecil cave and screening of their biological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26, 1587–1595.
- Hamim, A., Boukeskase, A., Ouhdouch, Y., Farrouki, A., Barrijal, S., Miché, L., Mrabet, R., Duponnois, R., Hafidi, M., 2019. Phosphate solubilizing and PGR activities of

- ericaceous shrubs* microorganisms isolated from Mediterranean forest soil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 19, 101128.
- Hancock, R.E., 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* 1, 156–164.
- Hasegawa, T., Takizawa, M., Tanida, S., 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *The Journal of General and Applied Microbiology* 319-322.
- Hashizume, H., Hirose, S., Sawa, R., Muraoka, Y., Ikeda, D., Naganawa, H., Igarashi, M., 2004. Tripropeptins, novel antimicrobial agents produced by *Lysobacter* sp. *The Journal of Antibiotics* 57, 52–58.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., Lotfipour, F., 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 113, 723–736.
- Hayakawa, M., Yoshida, Y., Imura, Y., 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology* 96, 973–981.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3233–3241.
- Hoare, D.S., Work, E., 1957. The stereoisomers of α -diaminopimelic acid. 2. Their distribution in the bacterial order Actinomycetales and in certain Eubacteriales. *Biochemical Journal* 65, 441.
- Hobot, J.A., Carlemalm, E., Villiger, W., Kellenberger, E., 1984. Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *Journal of Bacteriology* 160, 143–152.
- Hopwood, D.A., 2003. *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 468–471.
- Hopwood, D.A., 1973. Genetics of the Actinomycetales., in: *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*. p. 131.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H., 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*—A laboratory manual.
- Hoshino, S., Okada, M., Awakawa, T., Asamizu, S., Onaka, H., Abe, I., 2017. Mycolic acid containing bacterium stimulates tandem cyclization of polyene macrolactam in a lake sediment derived rare actinomycete. *Organic Letters* 19, 4992–4995.
- Hoshino, S., Okada, M., Wakimoto, T., Zhang, H., Hayashi, F., Onaka, H., Abe, I., 2015a. Niizalactams A–C, Multicyclic Macrolactams Isolated from Combined Culture of *Streptomyces* with Mycolic Acid-Containing Bacterium. *J. Nat. Prod.* 78, 3011–3017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00804>
- Hoshino, S., Onaka, H., Abe, I., 2019. Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic acid-containing bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46, 363–374. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2100-y>
- Hoshino, S., Ozeki, M., Awakawa, T., Morita, H., Onaka, H., Abe, I., 2018a. Catenulobactins A and B, Heterocyclic Peptides from Culturing *Catenuloplanes* sp. with a Mycolic Acid-Containing Bacterium. *Journal of Natural Products* 81, 2106–2110.
- Hoshino, S., Ozeki, M., Wong, C.P., Zhang, H., Hayashi, F., Awakawa, T., Morita, H., Onaka, H., Abe, I., 2018b. Mirilactams C–E, Novel Polycyclic Macrolactams Isolated from Combined-Culture of *Actinosynnema mirum* NBRC 14064 and Mycolic Acid-Containing Bacterium. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 66, 660–667.

- Hoshino, S., Wakimoto, T., Onaka, H., Abe, I., 2015b. Chojalactones A–C, Cytotoxic Butanolides Isolated from *Streptomyces* sp. Cultivated with Mycolic Acid Containing Bacterium. *Org. Lett.* 17, 1501–1504. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b00385>
- Hoshino, S., Wong, C.P., Ozeki, M., Zhang, H., Hayashi, F., Awakawa, T., Asamizu, S., Onaka, H., Abe, I., 2018c. Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium. *The Journal of Antibiotics* 71, 653.
- Hoshino, S., Zhang, L., Awakawa, T., Wakimoto, T., Onaka, H., Abe, I., 2015c. Arcyriaflavin E, a new cytotoxic indolocarbazole alkaloid isolated by combined-culture of mycolic acid-containing bacteria and *Streptomyces cinnamoneus* NBRC 13823. *Journal of Antibiotics* 68, 342.
- Hosny, M.S., El-Shayeb, N.A., Abood, A., Abdel-Fattah, A.M., 2010. A potent chitinolytic activity of marine Actinomycete sp. and enzymatic production of chitooligosaccharides. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4, 615–623.
- Hsu, S.C., Lockwood, J.L., 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 29, 422–426.
- Huber, L., Giguère, S., Slovis, N.M., Carter, C.N., Barr, B.S., Cohen, N.D., Elam, J., Erol, E., Locke, S.J., Phillips, E.D., Smith, J.L., 2019. Emergence of Resistance to Macrolides and Rifampin in Clinical Isolates of *Rhodococcus equi* from Foals in Central Kentucky, 1995 to 2017. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63, e01714-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01714-18>
- Hug, L.A., Beiko, R.G., Rowe, A.R., Richardson, R.E., Edwards, E.A., 2012. Comparative metagenomics of three *Dehalococcoides*-containing enrichment cultures: the role of the non-dechlorinating community. *BMC Genomics* 13, 327. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-327>
- Ibrahimi, M., Korichi, W., Loqman, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Lemee, L., 2019. Thermochemolysis–GC-MS as a tool for chemotaxonomy and predation monitoring of a predatory actinobacteria against a multidrug resistant bacteria. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 104740. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2019.104740>
- Ibrahimi, M., Korichi, W., Hafidi, M., Lemee, L., Ouhdouch, Y., Loqman, S., 2020. Marine Actinobacteria: Screening for Predation Leads to the Discovery of Potential New Drugs against Multidrug-Resistant Bacteria. *Antibiotics* 9, 91.
- Igarashi, Y., Kim, Y., In, Y., Ishida, T., Kan, Y., Fujita, T., Iwashita, T., Tabata, H., Onaka, H., Furumai, T., 2010. Alchivemycin A, a bioactive polycyclic polyketide with an unprecedented skeleton from *Streptomyces* sp. *Organic Letters* 12, 3402–3405.
- Ikeda, H., Shin-ya, K., Omura, S., 2014. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41, 233–250.
- Imai, H., Suzuki, K.-I., Morioka, M., Numasaki, Y., Kadota, S., Nagai, K., Sato, T., Iwanami, M., Saito, T., 1987. Okilactomycin, a novel antibiotic produced by a *Streptomyces* species. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* 40, 1475–1482. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.1475>
- Irschik, H., Gerth, K., Höfle, G., Kohl, W., Reichenbach, H., 1983. The myxopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *The Journal of Antibiotics* 36, 1651–1658.
- Ishizawa, S., Araragi, M., 1976. Composition of actinomycete population in soil. Actinomycetes, the boundary microorganisms. Arai T.(Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo 97–107.

- János, B., József, Z., Mária, H., István, H., Károly, M., 1971. Antibiotics produced by *Streptomyces*. VII: Cytotetrin, a new antitumor antibiotic. *The Journal of Antibiotics* 24, 209–214.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Svendsen, A.B., 1987. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Literature Review. Aspects of the Test Methods. *Planta Med* 53, 395–398. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962755>
- Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W., 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1102–1108.
- Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J., Fenical, W., 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology* 7, 1039–1048.
- Jourdain, M.-L., Velard, F., Pierrard, L., Sergheraert, J., Gangloff, S.C., Braux, J., 2019. Cationic antimicrobial peptides and periodontal physiopathology: A Systematic Review. *Journal of Periodontal Research*.
- Jurkevitch, E., 2007. Predatory behaviors in bacteria-diversity and transitions. *Microbe-American Society for Microbiology* 2, 67.
- Jurkevitch, E., Davidov, Y., 2006. Phylogenetic Diversity and Evolution of Predatory Prokaryotes, in: Jurkevitch, E. (Ed.), *Predatory Prokaryotes, Microbiology Monographs*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 11–56. https://doi.org/10.1007/7171_052
- Jurkevitch, É., Jacquet, S., 2017. *Bdellovibrio* et organismes apparentés-Des prédateurs bactériens hors du commun! *médecine/sciences* 33, 519–527.
- Kadouri, D., Venzon, N.C., O'Toole, G.A., 2007. Vulnerability of pathogenic biofilms to *Micavibrio aeruginosavorus*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 605–614.
- Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., Vergnes, M.-F., 2008. Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie* 6, 160–164.
- Kaneda, T., 1991. Iso-and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews* 55, 288–302.
- Katz, E., Demain, A.L., 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Reviews* 41, 449.
- Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y., 2009. Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL_113. *Letters in Applied Microbiology* 49, 484–490.
- Keane, R., Berleman, J., 2016. The predatory life cycle of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology* 162, 1–11.
- Khanna, R., Ghosh, J., Poldrack, R., Koyejo, O., 2015. Sparse submodular probabilistic PCA, in: *Artificial Intelligence and Statistics*. pp. 453–461.
- Khattabi, A., 2005. Isolement et étude taxonomique de deux souches d'actinomycètes d'origine marine productrices de substances antifongiques non polyénique. Université Chouaib Doukkali.
- Kim, Y., In, Y., Ishida, T., Onaka, H., Igarashi, Y., 2013. Biosynthetic origin of alchivemycin A, a new polyketide from *Streptomyces* and absolute configuration of alchivemycin B. *Organic Letters* 15, 3514–3517.
- Kiss, H., Nett, M., Domin, N., Martin, K., Maresca, J.A., Copeland, A., Lapidus, A., Lucas, S., Berry, K.W., Del Rio, T.G., others, 2011. Complete genome sequence of the filamentous gliding predatory bacterium *Herpetosiphon aurantiacus* type strain (114-95 T). *Standards in Genomic Sciences* 5, 356.
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioa, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., 2005. Isolation of

- actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale* 15, 45–51.
- Klevens, R.M., Morrison, M.A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L.H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J.M., 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama* 298, 1763–1771.
- Koehbach, J., Craik, D.J., 2019. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends in Pharmacological Sciences* 40, 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.04.012>
- Kohl, W., Irschik, H., Reichenbach, H., Höfle, G., 1983. Antibiotika aus Gleitenden Bakterien, XVII. Myxopyronin A und B – zwei neue Antibiotika aus *Myxococcus fulvus* Stamm Mx f50. *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 1656–1667. <https://doi.org/10.1002/jlac.198319831003>
- Kokare, C.R., 2008. *Pharmaceutical microbiology-principles and applications*. Nirali Prakashan 3.
- Konev, I., Efimova, V.M., Etingov, E.D., Zaval'naia, N.M., 1978. *Streptoverticillium griseoviridum* n. sp., a producer of the candidin-amphotericin B group, antifungal heptaene nonaromatic antibiotic 0185. *Antibiotiki* 23, 143–148.
- Korp, J., Gurovic, M.S.V., Nett, M., 2016. Antibiotics from predatory bacteria. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 12, 594.
- Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., 2007. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift für Natur for Schung C* 62, 507–513.
- Koval, S.F., Hynes, S.H., Flannagan, R.S., Pasternak, Z., Davidov, Y., Jurkevitch, E., 2013. *Bdellovibrio exovor* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 146–151.
- Krasil'nikov, N.A., 1960. Taxonomic principles in the actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 79, 65.
- Kreutzer, M.F., Kage, H., Nett, M., 2012. Structure and biosynthetic assembly of cupriachelin, a photoreactive siderophore from the bioplastic producer *Cupriavidus necator* H16. *Journal of the American Chemical Society* 134, 5415–5422.
- Krug, D., Zurek, G., Revermann, O., Vos, M., Velicer, G.J., Müller, R., 2008. Discovering the Hidden Secondary Metabolome of *Myxococcus xanthus*: a Study of Intraspecific Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3058–3068. <https://doi.org/10.1128/AEM.02863-07>
- Krylov, V.N., 2001. Phagotherapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, perspectives, safety, limitations. *Genetika* 37, 869–887.
- Kumar, V., Bharti, A., Gupta, V.K., Gusain, O., Bisht, G.S., 2012. Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 871–880.
- Kumbhar, C., Mudliar, P., Bhatia, L., Kshirsagar, A., Watve, M., 2014. Widespread predatory abilities in the genus *Streptomyces*. *Archives of Microbiology* 196, 235–248.
- Kumbhar, C., Watve, M., 2013. Why antibiotics: A comparative evaluation of different hypotheses for the natural role of antibiotics and an evolutionary synthesis. *Nat Sci* 5: 26– 40.
- Kunze, B., Bedorf, N., Kohl, W., Höfle, G., Reichenbach, H., 1989. Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis* (Myxobacterales). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 42, 14–17.
- Kunze, B., Reichenbach, H., Augustiniak, H., Höfle, G., 1982. Isolation and identification of althiomycin from *Cystobacter fuscus* (Myxobacterales). *The Journal of Antibiotics* 35, 635–636.

- Lacey, J., 1973. Actinomycetes in soils, composts and fodders, in: Symp Ser Soc Appl Bacteriol. In Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance; Sykes, G., Skinner, F.A., Eds.; Academic Press: London, UK, 1973; pp. 231–251.
- Lam, S.J., O'Brien-Simpson, N.M., Pantarat, N., Sulistio, A., Wong, E.H.H., Chen, Y.-Y., Lenzo, J.C., Holden, J.A., Blencowe, A., Reynolds, E.C., Qiao, G.G., 2016. Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nat Microbiol* 1, 1–11. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.162>
- Landy, M., Warren, G.H., Rosenman, S.B., Colio, L.G., 1948. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 67, 539–541.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* 115–175.
- Larpent, J.-P., Sanglier, J.-J., 1989. *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson.
- LaVergne, S., Hamilton, T., Biswas, B., Kumaraswamy, M., Schooley, R.T., Wooten, D., 2018. Phage Therapy for a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Craniectomy Site Infection. *Open Forum Infect Dis* 5. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy064>
- Le Minor, L., Sansonetti, P., Richard, C.L., Grimont, F., Mollaret, H.H., Bercovier, H., 1989. *Entérobactéries*. *Bactériologie médicale*. Paris: Flammarion 389–472.
- Lechevalier, H., Lechevalier, M.P., 1965. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique, in: *Annales de l'institut pasteur*. Masson editeur 21 street camille desmoulins, ISSY, 92789 Moulinaux cedex 9 ..., pp. 662–+.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P., 1970. A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes., in: *The Actinomycetales*. The Jena International Symposium on Taxonomy, September 1968. pp. 393–405.
- Lechevalier, M.P., 1980. The chemotaxonomy of actinomycetes. *Actinomycete taxonomy* 227–291.
- Lechevalier, M.P., De Bievre, C., Lechevalier, H., 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology* 5, 249–260.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H., 1985. Biology of Actinomycetes Not Belonging to the Genus *Streptomyces*, *Biology of Industrial Microorganisms*, Demin, AL and Solomon, NA, Eds. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings.
- Lee, K.H., Kim, J.H., Lim, D.S., Kim, C.H., 2000. Anti-leukaemic and Anti-mutagenic Effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate Isolated from *Aloe vera* Linne. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52, 593–598.
- Lerner, T.R., Lovering, A.L., Bui, N.K., Uchida, K., Aizawa, S.-I., Vollmer, W., Sockett, R.E., 2012. Specialized peptidoglycan hydrolases sculpt the intra-bacterial niche of predatory *Bdellovibrio* and increase population fitness. *PLoS Pathog* 8, e1002524.
- Li, S., Jochum, C.C., Yu, F., Zaleta-Rivera, K., Du, L., Harris, S.D., Yuen, G.Y., 2008. An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain C3: antimicrobial activity and role in plant disease control. *Phytopathology* 98, 695–701.
- Lieberman, J.M., 2003. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 22, 1143–1151.
- Lin, D., McBride, M.J., 1996. Development of techniques for the genetic manipulation of the gliding bacteria *Lysobacter enzymogenes* and *Lysobacter brunescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 896–902.
- Liu, T., Wu, S., Zhang, R., Wang, D., Chen, J., Zhao, J., 2019. Diversity and antimicrobial potential of *Actinobacteria* isolated from diverse marine sponges along the Beibu Gulf of the South China Sea. *FEMS Microbiology Ecology*.

- Livingstone, P.G., Morphew, R.M., Cookson, A.R., Whitworth, D.E., 2018. Genome Analysis, Metabolic Potential, and Predatory Capabilities of *Herpetosiphon llansteffanense* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e01040–18.
- Lode, H., 2010. Safety and tolerability of commonly prescribed oral antibiotics for the treatment of respiratory tract infections. *The American Journal of Medicine* 123, S26–S38.
- Loqman, S., 2009. La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine (PhD Thesis). Reims.
- Loqman, S., Barka, E.A., Clément, C., Ouhdouch, Y., 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 81–91.
- Lorcy, A., Dubé, E., 2018. Les enjeux des bactéries multi-résistantes à l'hôpital. Innovations technologiques, politiques publiques et expériences du personnel. *Anthropologie & Santé. Revue internationale francophone d'anthropologie de la santé.*
- Lotfy, M.M., Hassan, H.M., Hetta, M.H., El-Gendy, A.O., Mohammed, R., 2018. Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 7, 263–269.
- Lowy, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* 339, 520–532.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whitman, W.B., 2012. Road map of the phylum *Actinobacteria*, in: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, pp. 1–28.
- Maanan, M., 2008. Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region. *Environmental Pollution* 153, 176–183.
- Makkar, N.S., Casida Jr, L.E., 1987. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37, 323–326.
- Mangin, L., 2016. Antibiotiques et résistances: enquête sur les connaissances et les comportements du grand public (PhD Thesis). Université de Lorraine.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.-K., 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research, Medicinal Extracts in Microbiology* 169, 262–278. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.014>
- Manteca, A., Mäder, U., Connolly, B.A., Sanchez, J., 2006. A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death. *Proteomics* 6, 6008–6022.
- Mariat, F., Sebald, M., 1990. Les actinomycètes. *Leminor L. Bactériologie.*
- Markelova, N.Y., 2010. Predacious bacteria, *Bdellovibrio* with potential for biocontrol. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213, 428–431. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.08.004>
- Martin, M.O., 2002. Predatory prokaryotes: an emerging research opportunity. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 4, 467–478.
- Massias, B., 2008. Development of Molecular Tools for the Identification of Complex Bacterial Flora-Application to the Study of Galliform Gut Flora (PhD Thesis). INAPG (AgroParisTech).
- Mast, Y., Stegmann, E., 2019. Actinomycetes: The Antibiotics Producers. *Antibiotics* 8, 105. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030105>
- Mayer, F.L., Ellersieck, M.R., 1986. Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.

- McBride, M.J., Xie, G., Martens, E.C., Lapidus, A., Henrissat, B., Rhodes, R.G., Goltsman, E., Wang, W., Xu, J., Hunnicutt, D.W., others, 2009. Novel features of the polysaccharide-digesting gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* as revealed by genome sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6864–6875.
- McBride, M.J., Zusman, D.R., 1996. Behavioral analysis of single cells of *Myxococcus xanthus* in response to prey cells of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 137, 227–231.
- McCutcheon, J.P., von Dohlen, C.D., 2011. An interdependent metabolic patchwork in the nested symbiosis of mealybugs. *Curr. Biol.* 21, 1366–1372. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.051>
- McNabb, A., Shuttleworth, R., Behme, R., Colby, W.D., 1997. Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1361–1368.
- Meiser, P., Bode, H.B., Müller, R., 2006. The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *PNAS* 103, 19128–19133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606039103>
- Miguélez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B., 1999. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of Cell Biology* 145, 515–525.
- Miyagawa, E., Azuma, R., Suto, T., 1979. Cellular fatty acid composition in Gram-negative obligately anaerobic rods. *The Journal of General and Applied Microbiology* 25, 41–51.
- Miyanaga, S., Obata, T., Onaka, H., Fujita, T., Saito, N., Sakurai, H., Saiki, I., Furumai, T., Igarashi, Y., 2006. Absolute Configuration and Antitumor Activity of Myxochelin A Produced by *Nonomuraea pusilla* TP-A0861†. *J Antibiot* 59, 698–703. <https://doi.org/10.1038/ja.2006.93>
- Mouissi, S., Alayat, H., 2016. Utilisation de l'analyse en composantes principales (ACP) pour la caractérisation physico-chimique des eaux d'un écosystème aquatique: Cas du Lac Oubéira (Extrême NE Algérien)[Use of the principal component analysis (PCA) for physico-chemical characterization of an aquatic ecosystem waters: Case of Oubeira Lake (Extreme Northeastern Algeria)]. *Journal of Materials and Environmental Science* 7, 2214–2220.
- Moulder, J.W., 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiological Reviews* 49, 298.
- Muller, A., 2017. Bon usage des antibiotiques: résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé (PhD Thesis). Université Bourgogne Franche-Comté.
- Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F.J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., 2016. Myxobacteria: moving, killing, feeding, and surviving together. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J., Tahara, S., 1999. Possible Role of Xanthobaccins Produced by *Stenotrophomonas* sp. Strain SB-K88 in Suppression of Sugar Beet Damping-Off Disease. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4334–4339.
- Nett, M., Erol, Ö., Kehraus, S., Köck, M., Krick, A., Eguereva, E., Neu, E., König, G.M., 2006. Siphonazole, an unusual metabolite from *Herpetosiphon* sp. *Angewandte Chemie International Edition* 45, 3863–3867.
- Nikaido, H., 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry* 78, 119–146.

- Nordmann, P., Demord, A., Poirel, L., D'Emidio, F., Pomponio, S., 2019. Detection rapide des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi. Médecine et Maladies Infectieuses, 20es Journées Nationales d'Infectiologie - 5-7 juin 2019 - Centre des Congrès de Lyon 49, S47. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.04.121>
- O'Donnell AG. 1988. Recognition of novel actinomycetes. In Goodfellow MM, Williams ST, Mordarski M (ed), Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London, United Kingdom p 69–88
- Okami, Y., Hotta, K., 1988. editors, Goodfellow M., Williams ST and Mordarski M. Academic Press Inc, New York.
- Okeke, I.N., Lamikanra, A., Edelman, R., 1999. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. Emerging Infectious Diseases 5, 18.
- Olano, C., García, I., González, A., Rodriguez, M., Rozas, D., Rubio, J., Sánchez-Hidalgo, M., Braña, A.F., Méndez, C., Salas, J.A., 2014. Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. Microb Biotechnol 7, 242–256. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12116>
- Omura, S., 2011. Microbial metabolites: 45 years of wandering, wondering and discovering. Natural Product Updates 67, 6420–6459.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., Furumai, T., 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. Appl. Environ. Microbiol. 77, 400–406.
- Organisation mondiale de la Santé, 2016. Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens.
- Ortiz, A., Sansinenea, E., 2018. Di-2-ethylhexylphthalate May Be a Natural Product, Rather than a Pollutant. Journal of Chemistry 2018.
- Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L.F., Yakoleff, V., 2013. Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Elsevier.
- O'Sullivan, J., McCullough, J.E., Tymiak, A.A., Kirsch, D.R., Trejo, W.H., Principe, P.A., 1988. Lysobactin, a novel antibacterial agent produced by *Lysobacter* sp. The Journal of Antibiotics 41, 1740–1744.
- Othman, B.A., Askora, A., Awny, N.M., Abo-Senna, A.S.M., 2008. Characterization of virulent bacteriophages for *Streptomyces griseoflavus* isolated from soil. Pak. J. Biotechnol 5, 109–119.
- Ouchari, L., 2019. Actinobactéries du sable aride de Merzouga: diversité taxonomique et activité antimicrobienne. Thèse de doctorat. Cadi Ayyad, Marrakech.
- Ouchari, L., Boukeskase, A., Bouizgarne, B., Ouhdouch, Y., 2019. Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity. Biology Open 8, bio035410.
- Ouhdouch, Y., 1996. Antibiotiques antifongiques produits par les actinomycètes : screening, caractérisation structurale et métabolique d'une souche active de *Kitasatospora*. Cadi Ayyad, Marrakech.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finance, C., 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. European Journal of Soil Biology 37, 69–74.
- Park, H.B., Park, J.-S., Lee, S.I., Shin, B., Oh, D.-C., Kwon, H.C., 2017. Gordonic acid, a polyketide glycoside derived from bacterial coculture of *Streptomyces* and *Gordonia* Species. Journal of Natural Products 80, 2542–2546.
- Park, J.-H., Kim, Y.-J., Binn-Kim, Seo, K.-H., 2018. Spread of multidrug-resistant *Escherichia coli* harboring integron via swine farm waste water treatment plant. Ecotoxicology and Environmental Safety 149, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.071>

- Parkes, R.J., 1987. Analysis of microbial communities within sediments using biomarkers, in: SGM Symposium Series 41. Cambridge University Press, pp. 147–177.
- Parry, J.D., 2004. Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Advances in Applied Microbiology* 54, 167–196.
- Parte, A., 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer Science & Business Media.
- Pasternak, Z., Njagi, M., Shani, Y., Chanyi, R., Rotem, O., Lurie-Weinberger, M.N., Koval, S., Pietrokovski, S., Gophna, U., Jurkevitch, E., 2014. In and out: an analysis of epibiotic vs periplasmic bacterial predators. *The ISME Journal* 8, 625–635.
- Patras, A., Brunton, N.P., Downey, G., Rawson, A., Warriner, K., Gernigon, G., 2011. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on in vitro antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 250–256.
- Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F.J., Muñoz-Dorado, J., 2016. Bacterial predation: 75 years and counting! *Environmental Microbiology*.
- Pettit, R.K., 2009. Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 83, 19–25. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1916-9>
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H., Fiedler, H.-P., 2000. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnology* 80, 135–142. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00249-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00249-2)
- Philip, D., Kaleena, P.K., Valivittan, K., 2011. GC-MS analysis and antibacterial activity of chromatographically separated pure fractions of leaves of *Sansevieria roxburghiana*. *Asian J Pharm Clin Res* 4, 130–133.
- Pickens, C., Qi, C., Paonessa, J. r., Donnelly, H., Borkowski, N., Wunderink, R. g., 2019. Use of a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Automated Polymerase Chain Reaction (A-PCR) Assay Significantly Decreases Vancomycin Use in the Medical Intensive Care Unit, in: B105. Critical care: Counterparts - non-pulmonary critical care and multi-organ failure, American Thoracic Society International Conference Abstracts. American Thoracic Society, pp. A4124–A4124. https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2019.199.1_MeetingAbstracts.A4124
- Porter, J.N., 1971. Prevalence and distribution of antibiotic-producing actinomycetes, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 73–92.
- Potterat, O., Stephan, H., Metzger, J.W., Gnau, V., Zähler, H., Jung, G., 1994. Aborycin – A Tricyclic 21-Peptide Antibiotic Isolated from *Streptomyces griseoflavus*. *Liebigs Annalen der Chemie* 1994, 741–743. <https://doi.org/10.1002/jlac.199419940716>
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2007. *Microbiologie*. De Boek & Larcier, Bruxelles, pp. 805–825.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2003. *Microbiologie*. 2e éd. Bruxelles: De Boeck 1139.
- Quezada, M., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Moreno, G., López-Marín, L.M., 2007. The use of fatty acid methyl esters as biomarkers to determine aerobic, facultatively aerobic and anaerobic communities in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiol Lett* 266, 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00509.x>
- Quinn, G.R., Skerman, V.B., 1980. *Herpetosiphon*—Nature's scavenger? *Current Microbiology* 4, 57–62.
- Quinn, R., 2013. Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative. *American Journal of Public Health* 103, 426–434.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., De Souza, J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 537.

- Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Parvathaneni, S.P., Koude, D., Sripadi, P., Misra, S., Amanchy, R., Upadhyayula, S.M., 2017. Isolation and characterization of phthalates from *Brevibacterium mcbrellneri* that cause cytotoxicity and cell cycle arrest. EXCLI Journal 16, 375.
- Rajivgandhi, G., Ramachandran, G., Maruthupandy, M., Vaseeharan, B., Manoharan, N., 2019. Molecular identification and structural characterization of marine endophytic actinomycetes *Nocardiopsis* sp. GRG 2 (KT 235641) and its antibacterial efficacy against isolated ESBL producing bacteria. Microbial Pathogenesis 126, 138–148.
- Ramaswamy, S., Musser, J.M., 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tubercle and Lung Disease 79, 3–29. <https://doi.org/10.1054/tuld.1998.0002>
- Ramesh, S., Mathivanan, N., 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25, 2103–2111.
- Rao, U.K., Narasimha Rao, P.L., 1967. Actinomycetes: part II- purification and pharmacological properties of champamycin-B from *Streptomyces champavatii*. Indian Journal of Experimental Biology 5, 39–43.
- Rateb, M.E., Ebel, R., Jaspars, M., 2018. Natural product diversity of *Actinobacteria* in the Atacama Desert. Antonie van Leeuwenhoek 111, 1467–1477.
- Ravat, F., Jault, P., Gabard, J., 2015. Bactériophages et phagothérapie: Utilisation de Virus Naturels pour traiter les infections bactériennes. Annals of Burns and Fire Disasters 28, 13.
- Raza, W., Yang, W., Shen, Q.R., 2008. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. Journal of Plant Pathology 419–430.
- Reichenbach, H., Höfle, G., 1993. Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. Biotechnology Advances 11, 219–277.
- Reponen, T.A., Gizenko, S.V., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Cole, E.C., 1998. Characteristics of airborne actinomycete spores. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3807–3812.
- Ripple, W.J., Beschta, R.L., 2004. Wolves and the ecology of fear: can predation risk structure ecosystems? BioScience 54, 755–766.
- Ritchie, N.J., Schutter, M.E., Dick, R.P., Myrold, D.D., 2000. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. Applied and Environmental Microbiology 66, 1668–1675.
- Rivera-Utrilla, J., Ocampo-Pérez, R., Méndez-Díaz, J.D., Sánchez-Polo, M., 2012. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies—a review. Journal of Environmental Management 109, 164–178.
- Rivière, J., 1975. Les applications industrielles de la microbiologie. Masson et Cie Editeurs, Paris.
- Romano, A.H., Nickerson, W.J., 1956. The biochemistry of the Actinomycetales. Studies on the cell wall of *Streptomyces fradiae*. Journal of Bacteriology 72, 478.
- Romano, S., Jackson, S.A., Patry, S., Dobson, A.D., 2018. Extending the “one strain many compounds”(OSMAC) principle to marine microorganisms. Marine drugs 16, 244.
- Rosenberg, E., Varon, M., 1984. Antibiotics and lytic enzymes, in: Myxobacteria. Springer, pp. 109–125.
- Ruby, E.G., 1992. The genus *Bdellovibrio*, in: The Prokaryotes. Springer, pp. 3400–3415.
- Rutledge, P.J., Challis, G.L., 2015. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. Nature Reviews Microbiology 13, 509.

- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., Van Der Lelie, D., Dow, J.M., 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7, 514–525.
- Said, H.S., Abdelmegeed, E.S., 2019. Emergence of multidrug resistance and extensive drug resistance among enterococcal clinical isolates in Egypt. *Infect Drug Resist* 12, 1113–1125. <https://doi.org/10.2147/IDR.S189341>
- Saleem, T.S.M., Ravi, V., Gauthaman, K., Saisivam, S., 2009. Microbial production and OSMAC study of *Streptomyces* species coded as G-16. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1, 57.
- Sangkhol, V., Skerman, V.B., 1981. *Saprospira* species—natural predators. *Current Microbiology* 5, 169–174.
- Sanglier, J.J., Trujill, M., 1997. Substances bioactives produites par les actinomycètes, stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol* 12, 269–276.
- Santos, I.C., Smuts, J., Choi, W.-S., Kim, Y., Kim, S.B., Schug, K.A., 2018. Analysis of bacterial FAMES using gas chromatography – vacuum ultraviolet spectroscopy for the identification and discrimination of bacteria. *Talanta* 182, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.074>
- Sasser, M., 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids.
- Saw, J.H., Yuryev, A., Kanbe, M., Hou, S., Young, A.G., Aizawa, S.-I., Alam, M., 2012. Complete genome sequencing and analysis of *Saprospira grandis* str. Lewin, a predatory marine bacterium. *Standards in Genomic Sciences* 6, 84.
- Schäberle, T.F., Schmitz, A., Zocher, G., Schiefer, A., Kehraus, S., Neu, E., Roth, M., Vassilyev, D.G., Stehle, T., Bierbaum, G., others, 2015. Insights into Structure–Activity Relationships of Bacterial RNA Polymerase Inhibiting Coralopyronin Derivatives. *Journal of Natural Products* 78, 2505–2509.
- Schatz, A., Bugle, E., Waksman, S.A., 1944. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 55, 66–69.
- Scherff, R.H., 1973. Control of bacterial blight of soybean by *Bdellovibrio bacteriovorus* 328, 400–402.
- Scherlach, K., Hertweck, C., 2009. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.* 7, 1753–1760. <https://doi.org/10.1039/b821578b>
- Schieferdecker, S., Domin, N., Hoffmeier, C., Bryant, D.A., Roth, M., Nett, M., 2015. Structure and Absolute Configuration of Auriculamide, a Natural Product from the Predatory Bacterium *Herpetosiphon aurantiacus*. *Eur. J. Org. Chem.* 2015, 3057–3062. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500181>
- Schieferdecker, S., König, S., Weigel, C., Dahse, H.-M., Werz, O., Nett, M., 2014. Structure and Biosynthetic Assembly of Gulmirecins, Macrolide Antibiotics from the Predatory Bacterium *Pyxidicoccus fallax*. *Chem. Eur. J.* 20, 15933–15940. <https://doi.org/10.1002/chem.201404291>
- Schink, B., 2002. Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 257–261.
- Schleifer, K.H., Kandler, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* 36, 407.
- Schofield, G.M., Schaal, K.P., 1981. A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *Microbiology* 127, 237–259.
- Schwudke, D., Strauch, E., Krueger, M., Appel, B., 2001. Taxonomic studies of predatory *bdellovibrios* based on 16S rRNA analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. *Systematic and Applied Microbiology* 24, 385–394.

- Seccareccia, I., Kost, C., Nett, M., 2015. Quantitative Analysis of *Lysobacter* Predation. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7098–7105. <https://doi.org/10.1128/AEM.01781-15>
- Senthilkumar, G., Madhanraj, P., Panneerselvam, A., 2011. Studies on the compounds and its antifungal potentiality of fungi isolated from paddy field soils of Jenbagapuram village, Thanjavur district, and south India. *Asian Journal of Pharmaceutical Research* 1, 19–21.
- Shadkani, F., Helleur, R., 2010. Recent applications in analytical thermochemolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 89, 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2010.05.007>
- Sharma, M., Manhas, R.K., 2019. Purification and characterization of actinomycins from *Streptomyces* strain M7 active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant *Enterococcus*. *BMC Microbiology* 19, 44.
- Shatzkes, K., Connell, N.D., Kadouri, D.E., 2017. Predatory bacteria: a new therapeutic approach for a post-antibiotic era. *Future Medicine*.
- Shi, W., Köhler, T., Zusman, D.R., 1993. Chemotaxis plays a role in the social behaviour of *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology* 9, 601–611.
- Shimkets, L.J., Dworkin, M., Reichenbach, H., 2006. The Myxobacteria, in: Dr, M.D.P., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, pp. 31–115. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_3
- Shimkets, L.J., Kaiser, D., 1982. Induction of coordinated movement of *Myxococcus xanthus* cells. *Journal of Bacteriology* 152, 451–461.
- Shin, D., Byun, W.S., Moon, K., Kwon, Y., Bae, M., Um, S., Lee, S.K., Oh, D.-C., 2018. Coculture of Marine *Streptomyces* sp. with *Bacillus* sp. Produces a New Piperazic Acid-Bearing Cyclic Peptide. *Frontiers in Chemistry* 6, 498.
- Shirling, E.T., Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16, 313–340.
- Shoji, J., Hino, H., Wakisaka, Y., Koizumi, K., Mayama, M., Matsuura, S., 1977. Isolation of two new polymyxin group antibiotics. *The Journal of Antibiotics* 30, 1029–1034.
- Sierra, G., 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 23, 15–22.
- Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16, 402–413. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>
- Sinclair, A.R.E., Mduma, S., Brashares, J.S., 2003. Patterns of predation in a diverse predator–prey system. *Nature* 425, 288–290.
- Singh, B.N., 1947. Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria. *Microbiology* 1, 1–10.
- Singh, S.B., Barrett, J.F., 2006. Empirical antibacterial drug discovery—foundation in natural products. *Biochemical pharmacology* 71, 1006–1015.
- Smaoui, S., 2010. Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés (PhD Thesis).
- Snyder, A.R., Williams, H.N., Baer, M.L., Walker, K.E., Stine, O.C., 2002. 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2089–2094.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, 479–491.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 2013. *Principles of fermentation technology*. Elsevier.

- Staneck, J.L., Roberts, G.D., 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 28, 226–231.
- Stansly, P.G., Schlosser, M.E., 1947. Studies on polymyxin: isolation and identification of *Bacillus polymyxa* and differentiation of polymyxin from certain known antibiotics. *Journal of Bacteriology* 54, 549.
- Starr, M.P., Baigent, N.L., 1966. Parasitic Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with Other Bacteria. *J. Bacteriol.* 91, 2006–2017.
- Steger, K., Jarvis, A.A., Vasara, T., Romantschuk, M., Sundh, I., 2007. Effects of differing temperature management on development of *Actinobacteria* populations during composting. *Research in Microbiology* 158, 617–624.
- Stolp, H., Petzold, H., 1962. Untersuchungen über einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivität für *Pseudomonas*-Bakterien. *Journal of Phytopathology* 45, 364–390.
- Stolyar, S., Van Dien, S., Hillesland, K.L., Pinel, N., Lie, T.J., Leigh, J.A., Stahl, D.A., 2007. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Mol. Syst. Biol.* 3, 92. <https://doi.org/10.1038/msb4100131>
- Streufert, J.M., 1977. Some effects of two phthalic acid esters on the life cycle of the midge (*Chironomus plumosus*) (PhD Thesis). University of Missouri-Columbia.
- SudhaSrikesavan, S., Selvam, M.M., 2012. Actinomycetes From Marine Sediment: Screening For Cytotoxicity, Identification and Analysis Of Bioactive Constituents By Gas Chromatography-Mass Spectrometry, in: International Conference on Bioscience, Biotechnology and Healthcare Sciences (ICBBS'2012) December 14-15, 2012 Singapore.
- Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H., Kakeya, H., 2016. Discovery and Total Synthesis of Streptoaminals: Antimicrobial [5, 5]-Spirohemiaminals from the Combined-Culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Angewandte Chemie* 128, 10434–10438.
- Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H., Kakeya, H., 2015. 5-Alkyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinolines, new membrane-interacting lipophilic metabolites produced by combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Organic Letters* 17, 1918–1921.
- Sun, T., LAI, H., SUO, Y., 2010. Screening of Antagonistic Actinomycetes against Animal Pathogen from Salty Environments and Optimizing of Fermentation Conditions. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica* 42.
- Sung, A., Gromek, S., Balunas, M., 2017. Upregulation and identification of antibiotic activity of a marine-derived *Streptomyces* sp. via co-cultures with human pathogens. *Marine Drugs* 15, 250.
- Suttle, C.A., Chan, A.M., 1994. Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3167–3174.
- Takahashi, Y., Nakashima, T., 2018. Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. *Antibiotics* 7, 45.
- Takahashi, Y., Omura, S., 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *The Journal of General and Applied Microbiology* 49, 141–154.
- Tamariz, J.H., Lezameta, L., Guerra, H., 2014. [Phagotherapy faced with *Staphylococcus aureus* methicilin resistant infections in mice]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 31, 69–77.
- Tanaka, Y., Omura, S., 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Annual Review of Microbiology* 47, 57–87.
- Tang-um, J., Niamsup, H., 2012. Extracellular amylase activity from endophytic *Streptomyces griseoflavus* P4. *Chiang Mai J. Sci* 39, 346–350.

- Tenconi, E., Traxler, M., Hoebreck, C., Van Wezel, G.P., Rigali, S., 2018. Prodiginine production in *Streptomyces coelicolor* correlates temporally and spatially to programmed cell death. *BioRxiv* 240689.
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine* 119, S3–S10.
- Theilleux, J., Leveau, J.Y., Bouix, M., 1993. The actinomycetes, in: *Industrial Microbiology: Microorganisms of Industrial Interest*. Tec & Doc Lavoisier Paris, France, pp. 468–488.
- Thomashow, M.F., Rittenberg, S.C., 1978. Penicillin-induced formation of osmotically stable spheroplasts in nongrowing *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology* 133, 1484–1491.
- Tischler, D., Van Berkel, W.J., Fraaije, M.W., 2019. *Actinobacteria*, a Source of Biocatalytic Tools. *Frontiers in Microbiology* 10, 800.
- Toumatia, O., Yekkour, A., Goudjal, Y., Riba, A., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N., Zitouni, A., 2015. Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *Journal of Basic Microbiology* 55, 221–228. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400202>
- Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., Coulibaly, A., 2012. Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d’*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *J. Appl. Biosci* 58, 4234–4242.
- Trick, I., Lingens, F., 1984. Characterization of *Herpetosiphon* spec. —A gliding filamentous bacterium from bulking sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 19, 191–198. <https://doi.org/10.1007/BF00256453>
- Ueda, K., Beppu, T., 2017. Antibiotics in microbial coculture. *The Journal of Antibiotics* 70, 361.
- Van der Meij, A., Worsley, S.F., Hutchings, M.I., van Wezel, G.P., 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 41, 392–416.
- Vaux, S., Nguyen, E., Alleaume, S., Blanckaert, K., Galas, M., Poujol, I., Venier, A.-G., Bernet, C., Carbonne, A., Simon, L., 2012. Signalement des infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* résistant à l’impipénème, France, août 2001-mai 2011. *Bull Epidémiol Hebd* 31–32.
- Velicer, G.J., Mendes-Soares, H., 2009. Bacterial predators. *Current Biology* 19, R55–R56. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.043>
- Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40, 277.
- 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, 495–548.
- Vestal, J.R., White, D.C., 1989. Lipid analysis in microbial ecology. *Bioscience* 39, 535–541.
- Vieira, A., Silva, Y.J., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., Ackermann, H.-W., Almeida, A., 2012. Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: in vitro and ex vivo experiments. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 3241–3249. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1691-x>
- Vijayakumar, R., Vijayanthi, G., Panneerselvam, A., Thajuddin, and N., 2015. *Actinobacteria*: A predominant source of antimicrobial compounds [WWW Document]. *Antimicrobials*. <https://doi.org/10.1201/b19224-11>
- Viju, N., Punitha, S.M.J., Satheesh, S., 2019. Antifouling potential of symbiotic marine bacterium *Bacillus subtilis* MUT: M15 associated with the cuttlefish *Sepia* sp.
- Vinarov, A.U., Robysheva, Z.N., Sidorenko, T.E., Dirina, E.N., 2002. Biotechnology of pigment melanin, in: *Proceedings of the 1st International Congress “Biotechnology-State of the Art and Prospects of Development”*. p.

- Vizioli, J., Salzet, M., 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 494–496.
- Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 149–167.
- Voytsekhovskaya, I.V., Axenov-Gribanov, D.V., Murzina, S.A., Pekkoeva, S.N., Protasov, E.S., Gamaiunov, S.V., Timofeyev, M.A., 2018. Estimation of antimicrobial activities and fatty acid composition of *Actinobacteria* isolated from water surface of underground lakes from Badzheyskaya and Okhotnichya caves in Siberia. *PeerJ* 6, e5832.
- Waghmare, S.R., Randive, S.A., Jadhav, D.B., Nadaf, N.H., Parulekar, R.S., Sonawane, K.D., 2019. Production of novel antimicrobial protein from *Bacillus licheniformis* strain JS and its application against antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Proteins and Proteomics* 1–6.
- Waksman, S.A., Woodruff, H.B., 1941. *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* 42, 231.
- Walsh, C., 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. *Antibiotics: actions, origins, resistance*.
- Ward, A.C., Bora, N., 2006. Diversity and biogeography of marine *Actinobacteria*. *Current Opinion in Microbiology* 9, 279–286.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology* 176, 386–390.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, Rge., Stackebrandt, E., 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37, 463–464.
- Welch, D.F., 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 422–438. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.4.422>
- Wenzel, S.C., Müller, R., 2009. Myxobacteria—‘microbial factories’ for the production of bioactive secondary metabolites. *Mol. BioSyst.* 5, 567–574. <https://doi.org/10.1039/B901287G>
- Williams, S.T., Cross, T., 1971. Chapter XI actinomycetes, in: *Methods in Microbiology*. Elsevier, pp. 295–334.
- Williams, S.T., Mordarski, M., Goodfellow, M., 1984. *The Biology of the Actinomycetes*. Academic Press.
- Xiao, Y., Gerth, K., Müller, R., Wall, D., 2012. Myxobacterium-produced antibiotic TA (myxovirescin) inhibits type II signal peptidase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 2014–2021.
- Xiao, Y., Wei, X., Ebright, R., Wall, D., 2011. Antibiotic production by myxobacteria plays a role in predation. *Journal of Bacteriology* 193, 4626–4633.
- Yagüe, P., Manteca, A., Simon, A., Diaz-Garcia, M.E., Sanchez, J., 2010. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3401–3404.
- Yamaguchi, H., Nakayama, Y., Takeda, K., Tawara, K., Maeda, K., Takeuchi, T., Umezawa, H., 1957. A new antibiotic, althiomycin. *The Journal of Antibiotics* 10, 195–200.
- Yamaguchi, T., 1965. Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 89, 444–453.
- Yu, M., Li, Y., Banakar, S.P., Liu, L., Shao, C., Li, Z., Wang, C., 2019. New Metabolites From the Co-culture of Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and

- Fungus *Rhinocladiella similis* 35. Front. Microbiol. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00915>
- Yutani, M., Taniguchi, H., Borjihan, H., Ogita, A., Fujita, K., Tanaka, T., 2011. Alliinase from *Ensifer adhaerens* and its use for generation of fungicidal activity. *AMB express* 1, 2.
- Zaffiri, L., Gardner, J., Toledo-Pereyra, L.H., 2012. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery* 25, 67–77.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111–129.
- Zeph, L.R., Casida, L.E., 1986. Gram-negative versus gram-positive (actinomycete) nonobligate bacterial predators of bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 819–823.
- Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y., Jin, M., Yu, X., 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable *Actinobacteria* isolated from five marine sponge species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 241–248.
- Zhi, X.-Y., Li, W.-J., Stackebrandt, E., 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 589–608.

Annexe 1 :

Milieux de cultures

1. Milieux de cultures

1. 1. Milieu Bennett

- D-glucose 10 g
- Peptone2 g
- Extrait de viande1 g
- Extrait de levure1 g
- Agar (pour Bennett gélosé)..... 15 g
- Eau distillée qsp 1000 mL

Ajuster à pH 7,3

Stériliser pendant 30 min à 110 °C.

1. 2. Gélose nutritive (GN) (Difco)

1. 3. Bouillon nutritif (BN) (Difco)

1. 4. Gélose Mueller-Hinton Thermo Scientific

1. 5. Bouillon Mueller-Hinton (Difco)

2. Les milieux d'identification des actinobactéries: ISP (International *Streptomyces* Project) (Shirling et Gottlieb, 1966)

2. 1. ISP1 (Tryptone-Yeast Extract):

- Tryptone 5 g
- Extrait de levure3 g
- Agar20 g
- Eau distillée qsp1000 mL

Ajuster à pH 7.0

Stériliser pendant 20 min à 120 °C.

2. 2. ISP2 (Yeast extract-malt extract):

- Extrait de malt.....10 g
- Extrait de levure4 g
- D-glucose.....4 g
- Agar20 g
- Eau distillée qsp1000 mL

Ajuster à pH 7.3

Stériliser pendant 20 min à 120 °C. 146

2. 3. ISP3 (Oatmeal agar):

- Solution d'avoine1000 mL
- Solution saline.....1 mL
- Agar20 g

Ajuster à pH 7.3

Stériliser pendant 20 min à 120 °C.

• Solution d'avoine:

- Grains d'avoine pilés.....20 g
- Eau distillée qsp.....1000 mL

Faire bouillir pendant 20 min. centrifuger puis reajuster le volume à 1000 mL à l'aide

D'eau distillée.

• Solution saline:

- FeSO₄, 7H₂O.0.1 g
- MnCl₂, 4H₂O0.1 g
- ZnSO₄, 7H₂O.....0.1 g
- Agar20 g

Eau distillée qsp.....1000 mL

2. 4. ISP4 (Inorganic salt-starch agar)

- Amidon10 g
- MgSO₄, 7H₂O.....1 g
- (NH₄)₂SO₄.....2 g
- K₂HPO₄1 g
- NaCl1 g
- CaCO₃2 g
- Solution saline.....1 g
- Agar20 g
- Eau distillée qsp1000 mL

Ajuster à pH 7.0 - 7.4

Stériliser pendant 20 min à 120 °C.

2. 5. ISP5 (Glycerol-asparagine agar):

- Glycéol.....10 g
- L-asparagine.....1 g
- K₂HPO₄1 g
- Solution saline1 g
- Agar20 g
- Eau distillée qsp.....1000 mL

Ajuster à pH 7.0 - 7.4

Stériliser pendant 20 min à 120 °C.

2. 6. ISP6 (Peptone-yeast extract agar):

- Peptone15 g
- Citrate de fer ammoniacal.....0.5g
- Thiosulfate de sodium.....0.08 g
- Extrait de levure1 g
- Protease peptone......5 g
- K₂HPO₄1 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée qsp1000 mL

Ajuster à pH 7.0 – 7.2

Stériliser pendant 20 min à 120 °C.

2. 7. ISP7(Tyrosine agar):

- Glycérol 15 g
- L-asparagine1 g
- L-tyrosine.....0.5 g
- MgSO₄, 7H₂O.....0.5 g
- K₂HPO₄.....0.5 g
- NaCl.....0.5 g
- Solution saline.....1 mL
- Agar20 g
- Eau distillée qsp1000 mL

Ajuster à pH 7.2 – 7.4

Stériliser pendant 20 min à 120 °C.

2. 8. ISP9:

- $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ 6.64 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4, 3\text{H}_2\text{O}$2.38 g
- K_2HPO_45.65 g
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$1 g
- Solution saline1 mL
- Agar20 g
- Eau distillée qsp1000 mL

Ajuster à pH 6.8 – 7.0

Stériliser pendant 20 min à 120 °C.

• Solution saline:

- $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$0.64 g
- $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$0.11 g
- $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$0.79 g
- $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g
- Eau distillée qsp100 mL

2. 9. Milieu Chitine Agar

- K_2HPO_4 0.7 g
- KH_2PO_4 0.3 g
- $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g
- $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g
- ZnSO_4 0.001 g
- MnSO_4 0.001 g
- Chitine4 g
- Agar.....18 g
- Eau distillée qsp1000 mL

Ajuster à pH 7.0 – 7.2 /Stériliser pendant 20 min à 120 °C.

Annexe 2 :

Spectres RMN

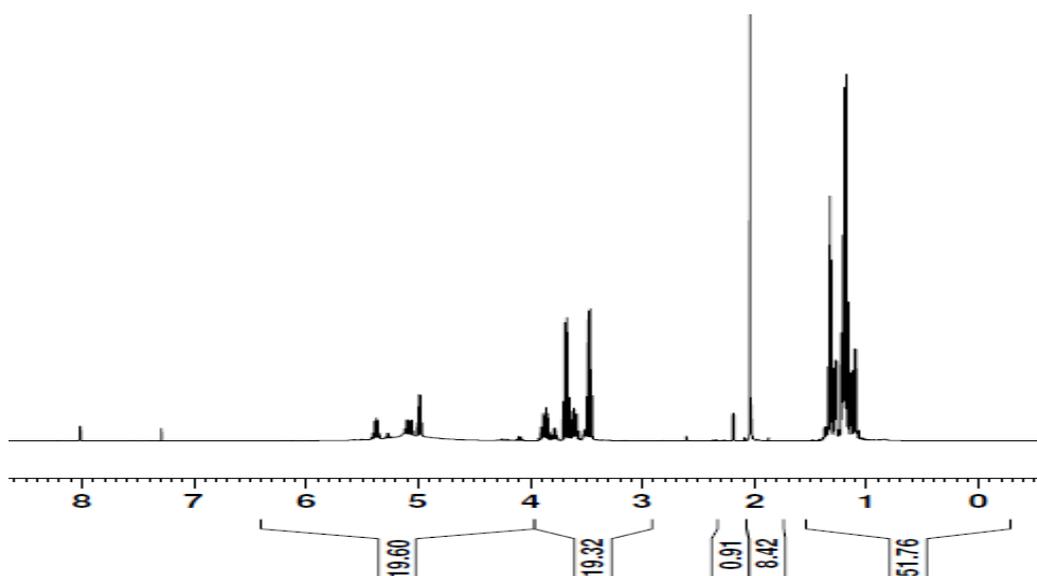


Figure 54. Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de la Fraction FC732

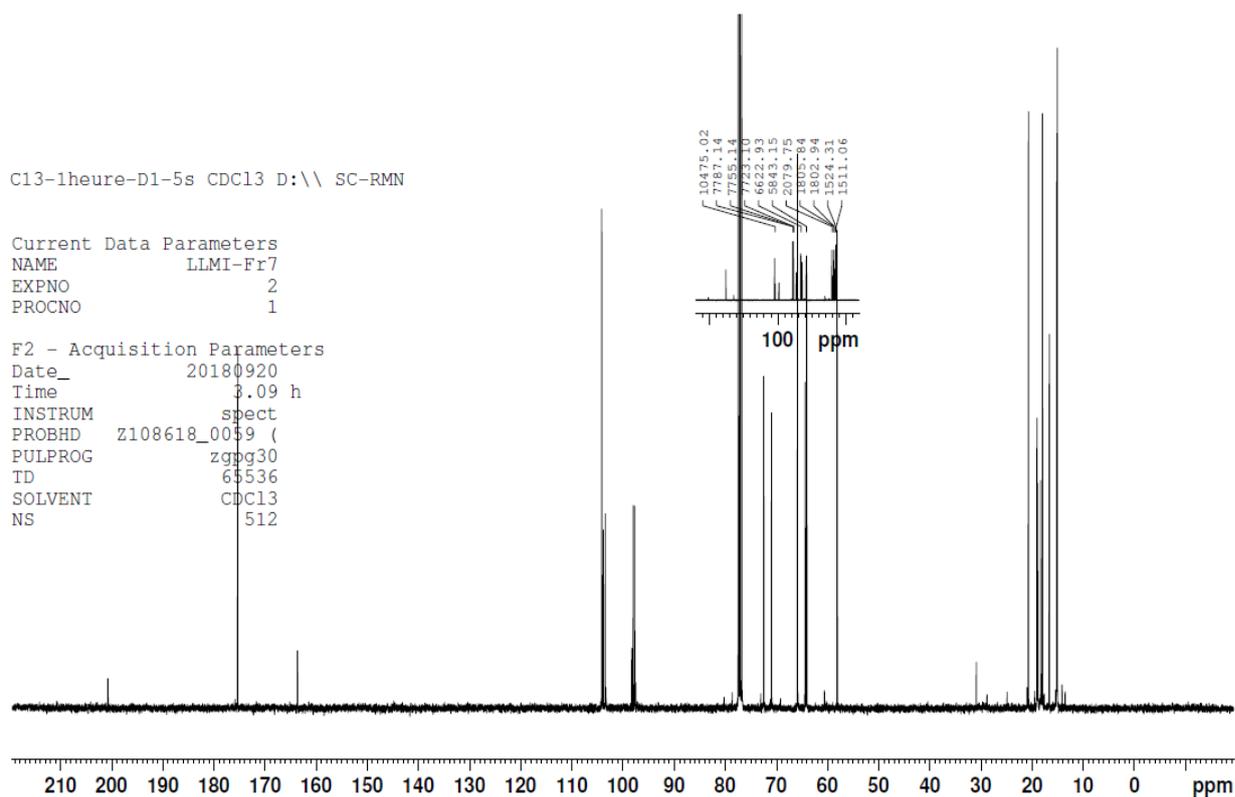


Figure 55. Spectre RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) de la Fraction FC732

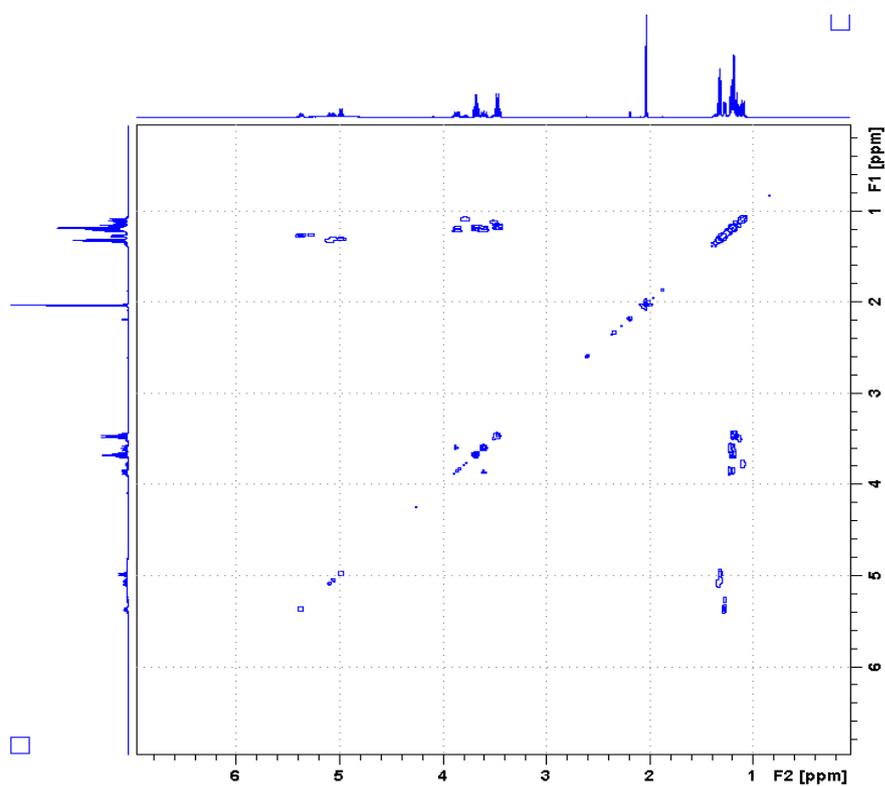


Figure 56. Spectre COSY ^1H - ^1H de la Fraction FC732

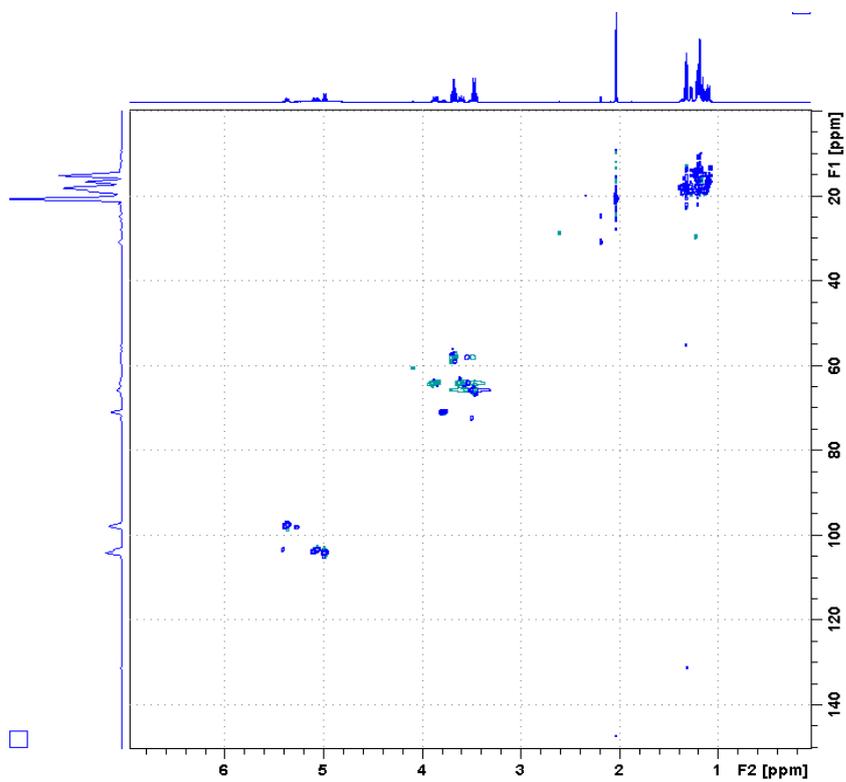


Figure 57. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C de la Fraction FC732

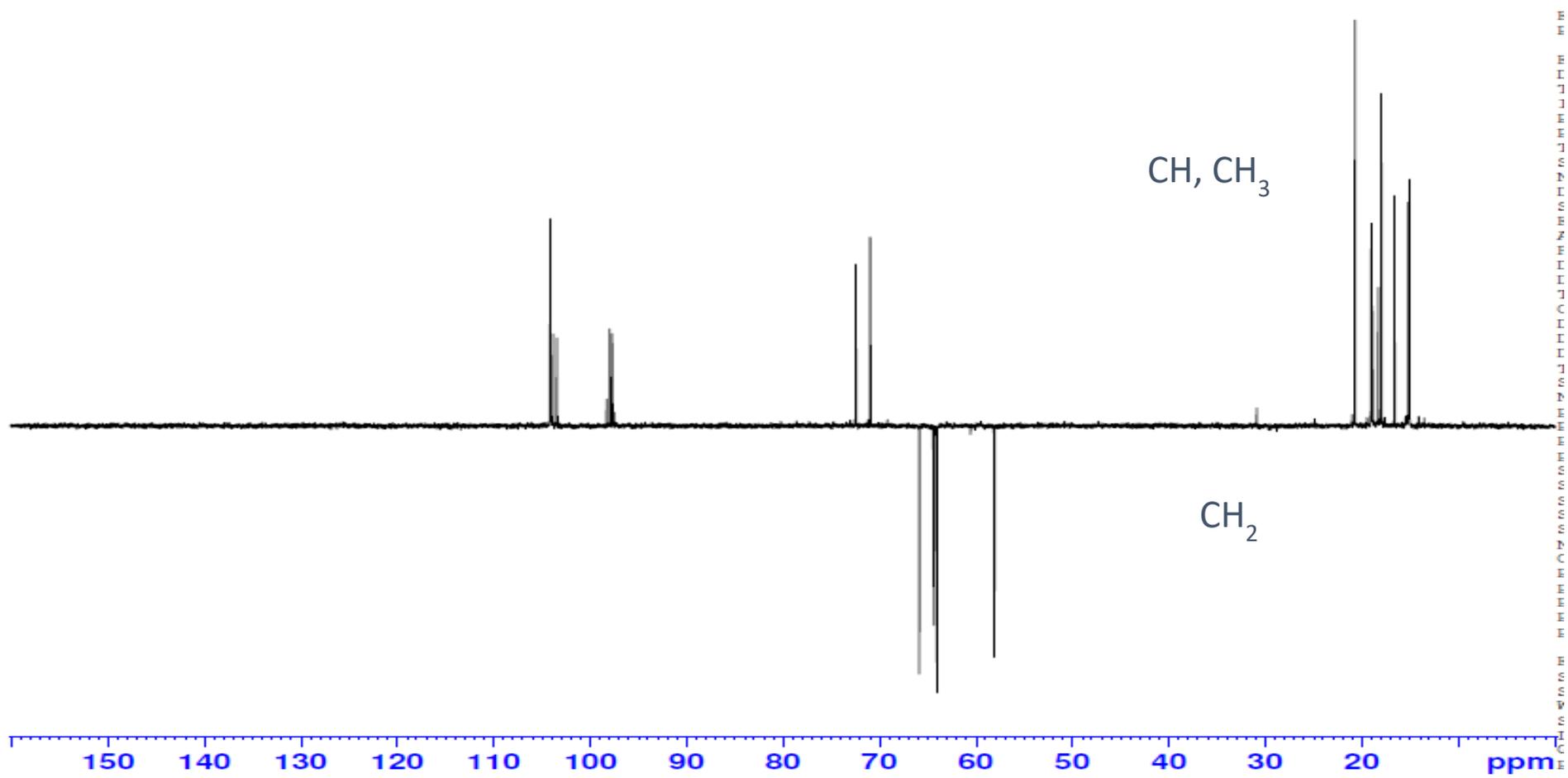


Figure 58. Spectre DEPT 135 de la Fraction FC732