

## Table des Matières

<b>REMERCIEMENTS</b>	
<b>AVANT PROPOS</b>	
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES CHROMATOGRAMMES.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</b>	<b>XV</b>
<b>ملخص</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>RÉSUMÉ</b>	
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre I : Revue Bibliographique</b>	
I. Les Actinobactéries.....	04
1. Historique.....	04
2. Définition des actinobactéries .....	04
3. Caractéristique générale d'actinobactéries .....	05
II. Taxonomie et critères de classification des actinobactéries.....	06
1. Systématique des actinobactéries.....	06
2. Evolution des critères d'identification .....	06
3. Critères actuels d'identification .....	08
3.1. Caractères morphologiques.....	08
3.1.1. Caractéristiques culturales ou macromorphologiques.....	08
3.1.1.1. Mycélium aérien .....	09
3.1.1.2. Mycélium de substrat .....	09
3.1.2. Caractéristiques micromorphologiques.....	09
3.2. Caractères chimiotaxonomiques (chimiotaxonomie).....	12
3.2.1. Constituants pariétaux: isomères de l'acide diaminopimélique et acides aminés.....	12
3.2.2. Glucides.....	12
3.2.3. Constituants membranaires et pariétaux: lipides.....	13
3.2.3.1. Les phospholipides.....	13
3.2.3.2. Les ménquinones.....	14
3.2.3.3. Acides gras.....	14
3.2.3.4. Les acides mycoliques.....	15
3.3. Critère physiologique et taxonomie numérique .....	15
3.4. Critères moléculaires.....	17
3.4.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S et phylogénie.....	17
3.4.2. Hybridation ADN-ADN et détermination du pourcentage de guanine-cytosine.....	17
3.4.3. Taux de GC.....	18
3.4.4. Séquençages de nouvelle génération (NGS).....	18
3.4.4.1. Préparation des banques ou librairies.....	20
3.4.4.2. PCR en émulsion.....	20
3.4.4.3. Bridge PCR .....	21
3.4.4.4. Séquençage Illumina .....	21
3.4.4.5. Annotation des génomes.....	23
III. Cycle de développement d'actinobactérie .....	25
1. Formation des spores par les actinobactéries .....	25

1.1. Les Exo-spores .....	27
1.2. Endospores.....	27
<b>IV. Habitat d'actinobactéries.....</b>	<b>28</b>
1. Environnement terrestres .....	29
2. Eaux douces et marines .....	29
3. l'Air .....	30
4. les Composts .....	30
5. les Végétaux, les animaux et l'homme.....	30
<b>V. Applications des actinobactéries .....</b>	<b>30</b>
1. Production des métabolites antimicrobiens (Les Antibiotiques).....	31
2. Production d'enzymes.....	32
3. Production des Bioherbicides.....	33
4. Production de Vitamines.....	34
5. Production de Pigments.....	35
6. Bioremédiation.....	35
7. Utilisation des actinobactéries en lutte biologique.....	36
<b>VI. Famille des <i>Streptomycétacées</i>.....</b>	<b>37</b>
1. Le genre <i>Streptomyces</i> .....	37
1.1. Classification du genre <i>Streptomyces</i> (Bergy's manual of systematic bacteriology, 2006).....	38
1.2. Cycle de développement.....	39
1.3. Caractéristiques du genre <i>Streptomyces</i> .....	39
1.3.1. génétique des <i>Streptomyces</i> .....	40
1.4. Identification moléculaire (ARN ribosomique 16S) des <i>Streptomyces</i> .....	40
1.4.1. limites de la PCR universelle 16S en tant qu'outil de définition de nouvelles espèces bactériennes.....	41
1.5. L'Hybridation ADN-ADN : .....	42
<b>VII. Les Antibiotiques.....</b>	<b>42</b>
1. Les cibles bactériennes des antibiotiques.....	45
2. Les antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyces</i> .....	45
3. Effet de la composition de milieux de culture sur la production des antibiotiques.....	45
4. Stratégie moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne.....	46

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

<b>I. Origine des échantillons de sol et isolement des actinobactéries.....</b>	<b>50</b>
1. Les échantillons de sols.....	50
2. Isolement des actinobactéries.....	51
2.1. Prétraitement des échantillons de sols.....	51
2.2. Les milieux de cultures utilisés.....	52
2.3. Préparation de la suspension-dilution et ensemencement.....	52
2.3.1.-Ensemencement en masse.....	53
2.3.2.-Ensemencement en surface.....	53
3. Reconnaissance des actinobactéries.....	53
4. Dénombrement et sélection des actinobactéries.....	53
5. Purification et conservation des actinobactéries.....	54
<b>II. Criblage de l'activité antimicrobienne des actinobactéries.....</b>	<b>54</b>
1. Souches de microorganismes-cibles.....	55
2. Test d'antagonismes (étude de l'activité antagonistes <i>in vitro</i> ).....	55
2.1. Méthode de stries croisées.....	55
2.2. Méthode des cylindres d'agar.....	56

2.3. Méthode de confrontation directe en boîte de Pétri.....	57
3. Choix des meilleurs isolats d'actinobactéries antagonistes.....	58
III. Etude de l'activité antibiotique de la souche sélectionnée « D2 ».....	58
1. Cinétiques de production des antibiotiques en milieu liquide.....	58
2. Préparation de pré-culture.....	58
2.1. Ensemencement en fioles agitées.....	59
2.2. Cinétique de production de la substance antimicrobienne.....	59
2.3. Extraction de la substance antimicrobienne (filtrat de culture).....	60
2.4. Choix de meilleur solvant d'extraction .....	60
2.5. Révélation microbiologique de la substance antimicrobienne « bio-autographie».....	61
2.6. Origine et caractéristiques des souches .....	62
2.7. Séparation de l'extrait brut sur chromatographie sur couche mince (CCM).....	62
2.8. Purification de la substance antimicrobienne par HPLC semi préparative.....	63
2.9. Etude spectrométrique du produit purifié.....	63
2.9.1. Spectrométrie de masse.....	63
IV. Taxonomie polyphasique des isolats d'actinobactéries antagonistes choisis.....	64
1. Etude morphologique.....	64
1.1 Etude macromorphologique et caractères culturaux .....	64
1.2 Etude micromorphologique .....	64
1.3. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) (Tresner <i>et al.</i> , 1961).....	64
2-Etude physiologique caractérisation physiologique des isolats d'actinobactéries.....	66
2.1. Production de pigments mélanoïdes .....	66
2.2.- Utilisation des composés glucides comme seules sources de carbone.....	66
2.3. Hydrolyse de l'amidon.....	67
2.4. Hydrolyse de la caséine.....	67
2.5. Hydrolyse de la gélatine (Test gélatinase).....	67
2.6. Recherche de nitrate réductase.....	67
2.7. Croissance en présence d'inhibiteurs (Résistance à divers agent chimiques).....	68
2.8. Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl.....	68
2.9. Croissance à différents pH.....	69
2.10. Croissance à différentes températures .....	69
2.11. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	69
3. Etude moléculaire.....	70
3.1.- Extraction de gène de l'ARN ribosomial 16S.....	70
3.2. Quantification de l'ADN.....	71
3.3.- Amplification par PCR et électrophorèse en gel d'agarose.....	71
3.4. Purification des produits PCR .....	72
3.5.- Séquençage de l'ARN ribosomial 16S.....	72
3.6- Analyse phylogénétique.....	73
3.7. Extraction de l'ADN génomique des deux isolats et séquençage.....	73

### Chapitre III : Résultats et Discussions

---

<b>PARTIE I : Isolement des actinobactéries des sols arides et semi arides et évaluation de leur potentiel antimicrobien.</b>	75
1. Isolement et dénombrement .....	75
2 Résultats de l'action antagoniste des isolats d'actinobactéries.....	80
2.1 Technique de stries croisées .....	80
2.2 Technique de cylindre d'agar.....	83

<b>PARTIE II : Production, purification et identification de l'antibiotique Secréte par la souche D2</b>	87
1. Production d'antibiotiques en milieux liquides.....	89
2. Production, extraction et semi purification des antibiotiques.....	90
2. 1. Production et extraction de l'antibiotique à partir des filtrats de culture .....	91
2. 2. Mise en culture de l'isolat D2 et extraction des antibiotiques et autobiographie.....	94
2. 3.Détection des antibiotiques par bio autographie .....	95
2. 4. Autobiographie de l'extrait brut de l'isolat D2 .....	95
2. 5. Analyse et purification des antibiotiques par HPLC.....	100
2. 5.1. Analyse par la technique d'HPLC.....	100
2. 5.2. Purification des antibiotiques de l'isolat D2 par HPLC.....	108
2. 5.3. Résultats de l'optimisation des paramètres d'HPLC .....	108
2. 6. Caractérisation spectrométrique des composés actifs.....	108
<b>PARTIE III : étude taxonomique des isolats d'actinobacteries sélectionnés.....</b>	<b>111</b>
III. Etude taxonomique des isolats.....	111
1. Etude des caractères morphologiques (aspect cultural).....	111
1.1. Etude macroscopique.....	117
1.2. Etude microscopique.....	117
1.3. Coloration de Gram.....	117
2. Résultats de l'étude physiologique .....	118
2.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	120
2.2. Production de pigments mélanoïdes .....	121
3. Résultats de l'étude physiologique et biochimique.....	123
4. Résultats de l'étude des paramètres physico-chimiques.....	123
5 Résultats de l'étude moléculaire.....	126
5.1. Identification Moléculaire des espèces (séquençage de gène de l'ARNr 16S)....	129
5.2. Identification moléculaire des deux isolats (D2 et Ms1).....	129
5.2.1 .Extraction de l'ADN génomique total des deux isolats (D2 et MS1). ....	129
5.2.1.1. Vérification de l'extraction de l'ADN.....	130
5.2.1.2. Séquençage de génome total des deux isolats D2 et MS1 .....	130
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>136</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>172</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>174</b>
<b>Productions scientifiques</b>	

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ADN 16S** : ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomale

**ANIB**: Average nucleotide identity blast (la moyenne des nucléotides identiques après BLAST)

**ATTC**: American Type Culture Collection

**BET**: Bromure d'éthydium

**BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CDCI3** : Cholorforme

**CFR** : Chloramphenicol and flor-fenicole resistant.

**CM** : Chloramphenicole

**CMB** : Concentration Minimale bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale inhibitrice

**DCM** : Dichlorométhane

**dNTP** : Désoxyribonucléotide triphosphate

**DO** : Densité Optique

**GGDC**: Genome-to-Genome Distance Calculator.

**GN** : Gélose nutritive

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography «**CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance »

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide Sulfurique

**INRA** : Institut National de Recherche Agronomique

**ISP** : International Streptomyces Project

**KDa** : Kilo Dalton

**MA** : Mycélium aérien

**MeOH**: Methanol

**MH**: Muller Hinon

**MHz**: Megahertz

**MS** : Mycélium du substrat

**MRSA** : Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

**NCBI**: National Center for Biotechnology Information

**NRPS**: Non-Ribosomal Peptide Synthetase

**NRRL**: Northern Regional Research Center

**PC:** Phosphatidylcholine

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**PEP:** phosphatidylethanolamine

**PHB:** Polyhydroxybutyrate

**Phe :** Phenylalanine

**PI :** Phosphatidylinositol

**PG :** Phospholipides contenant de la Glucosamine

**PKS :** Polyketides synthases

**PKSE :** Enediyne polyketide synthase

**PME :** Phosphatidylméthylethanolamine

**Ppm :** Partie par million

**P/V :** Poids /volume

**PS :** Pigment soluble

**Rt:** ( retention time) Rapport frontal

**RMN :** Résonance Magnétique Nucléaire

**RPM :** Rotation par minute

**SDS :** Sodium Dodecyl Sulphate

**Strep :** Streptomycine

**SSP :** Sous Espèce

**UFC :** Unité Formant colonies

**UV :** Ultraviolet

**V<sub>inj</sub>:** Volume injecté

**V/V :** Volume par Volume

**trs/min :** Tours/m

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Aspect macroscopique des colonies d'actinobactéries sur milieu ISP2 à 30 °C pendant 7 jours. (Photo. HARIR H., Mars 2014. LBMB. Algérie).....	5
<b>Figure 02</b> : Actinobactéries isolées sur milieu amidon caséine agar (a, c : Photos des boites de Pétri des isolats d'actinobacteries). (b, d : Morphologie des colonies individuelles).....	5
<b>Figure 03</b> : Croissance d'un isolat d'actinobactérie sur milieu agar de caséine et amidon. .a. mycélium aérien. b. mycélium de substrat (Ananda, 2016).....	9
<b>Figure 04</b> : Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (In Sabaou, 1988).....	10
<b>Figure 05</b> : Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de <i>Streptomyces</i> (Bergey's Manuel, 2012).....	11
<b>Figure 06</b> : Mycélium du substrat avec des chaines de spores de <i>Streptomyces</i> sur le milieu Amidon-Caséine incubée à jours/ 32°C (Srividool et Sukchotiratana, 2004).....	12
<b>Figure 07</b> : Structure générale des ménaquinones (Rodríguez Concepción et Boronat, 2013)....	14
<b>Figure 08</b> : Ordres de classe d'actinobactérie basée sur l'analyse des séquences ADNr 16S ....	19
<b>Figure 09</b> : Stratégie d'amplification par PCR en émulsion (PCRem).....	21
<b>Figure 10</b> Stratégie d'amplification par Bridge PCR .....	22
<b>Figure 11</b> : Les trois plateformes du séquençage haut débit .....	23
<b>Figure 12</b> : Amplification en pont de la technologie Illumina. .....	24
<b>Figure 13</b> : Aperçu de la technologie de séquençage Illumina .....	25
<b>Figure 14</b> : Schéma du cycle de vie de <i>Streptomyces</i> dans les conditions naturelles (Manteca et Sanchez, 2009).....	26
<b>Figure 15</b> : hyphe végétative et conidiospores de <i>S. coelicolor</i> , SI: spores immatures, BP: Bordure de la paroi, SM: spore matures (Chater et Hopwood, 1973).....	28
<b>Figure 16</b> : Développement du mycélium secondaire en spores (Saffroy, 2006).....	28
<b>Figure 17</b> : Applications biotechnologiques des actinobactéries. (Anandan, 2016).....	32
<b>Figure 18</b> : Antibiotiques produits par les actinobactéries. (Anandan ,2016).....	33
<b>Figure 19</b> : Différents types d'enzymes produits par les actinobacteries.a. Une Amylase. b. Protease. c. Lipase. La zone d'inhibition autour de l'inoculation d'actinobactéries confirme la production d'une enzyme particulière. (Anandan., 2016).....	..34
<b>Figure 20</b> : Pigment diffusible produit par diverses actinobactéries dans le milieu amidon - caséine agar (Anandan, 2016).....	..36
<b>Figure 21</b> : Classification du genre <i>Streptomyces</i> selon Bergy' Mannual of Systematic Bacteriology (2006).....	..39
<b>Figure 22</b> : Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide (Scherr et Nguyen, 2009)..	..40
<b>Figure 23</b> : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).....	..45
<b>Figure 24</b> : STREPTOMEDB, base de données pour la recherche des composés produits par les <i>Streptomyces</i> .....	..48
<b>Figure 25</b> : Métabolites secondaires représentatifs chez les espèces de <i>Streptomyces</i> (Hwang et al., 2014).....	..49
<b>Figure 26</b> : Sites de prélèvement des échantillons de sol.....	..51
<b>Figure 27</b> : Séchage des échantillons de sol dans un dessiccateur sous vide.....	..52
<b>Figure 28</b> : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide par la méthode des stries croisées (Boubetra et al, 2013).....	..56
<b>Figure 29</b> : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (Bastide et al., 1986 ; Lemriss et al.,2003) .....	..57
<b>Figure 30</b> : Méthode de confrontation direct en boite de Pétri entre l'isolat d'actinobactérie et l'agent phytopathogène.....	..58
<b>Figure 31</b> : Boite de Pétri représentant un isolement d'actinobactérie à partir d'un échantillon de sol de Boussada (Msila) (dilution 10 <sup>-4</sup> ).....	..77

<b>Figure 32</b> : Caractéristiques morphologiques et culturelles sur milieu ISP2 de 03 isolats d'actinobactéries obtenus de différents échantillons de sols.....	79
<b>Figure 33</b> : Colonies d'actinobactéries observées sous le microscope photonique (Gr. X400)...	80
<b>Figure 34 A</b> : Résultats de l'activité antibactérienne de l'isolat 10 vis-à-vis de bactéries Gram + et Gram – et des levures par la méthode de stries croisés.....	81
<b>Figure 34 B.</b> Mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode de stries croisées de l'isolat 10 vis-à-vis des 03 champignons phytopathogènes.....	81
<b>Figure 35</b> : Résultats de l'activité antimicrobienne des 0 4 isolats d'actinobactéries (10, MS1, C et D2) vis-à-vis des microorganismes bactériens (Technique de cylindre d'Agar).....	83
<b>Figure 36</b> : Résultats de l'activité antifongique des 03 isolats d'actinobactéries (10, MS1 et C) vis-à-vis des champignons phytopathogènes ( <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Fusarium colmorum</i> et <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i> ).....	84
<b>Figure 37</b> : Cinétiques de l'évolution du pH et de l'activité antibactérienne de l'isolat D2 sur milieu liquide ISP2 vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	88
<b>Figure 38</b> : Mise en évidence de l'activité antibiotique de l'isolat D2 par la méthode des trous après 05 jours d'incubation sur milieu ISP2 (test de filtrat de culture).....	89
<b>Figure 39</b> : Antibiographies de l'isolat D2 effectués sur milieu Muler Hinton.....	91
<b>Figure 40.</b> Chromatographie sur couche mince de l'extrait brut de l'isolat D2 en utilisant les deux systèmes de solvants (Méthanol / Acétate d'Ethyle) et (Dichlorométhane / Méthanol)....	95
<b>Figure 41.</b> Bioautographie.....	96
<b>Figure 42</b> : Activité antimicrobienne de l'extrait brut vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 et 25923 et <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC14990 avant l'injection à l'HPLC..	97
<b>Figure 43</b> : Test d'activité par antibiographie des fractions 1, 2, 3, 4, 5, 6,7 et 8 de la souche D2 contre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 et <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 (15µl par disque) testée par antibiographie.....	99
<b>Figure 44</b> : Exemples de deux composés (1,8-dihydroxy-2-méthyl-3- (4-métilpentanoyl) phénanthrène-9,10-dione et (Galvaquinone A) ayant deux fragmentation des ions ayant une valeur égale de composé analysé.....	109
<b>Figure 45 A:</b> Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat D2 sur milieu ISP4, observé au microscope optique (Gr.x100) (à gauche) ; (Gr.x400) (à droite).....	114
<b>Figure 45 B:</b> Observation au microscope électronique à balayage (Gr. x 3800) de l'isolat D2.....	115
<b>Figure 46 A :</b> Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat C poussant sur milieu ISP4 et observé au microscope optique (Gr.x100) (à gauche) (Gr. x400)(à droite).....	115
<b>Figure 46 B :</b> Observation au microscope électronique à balayage (Gr. x 3800 et 3000) de l'isolat C.....	115
<b>Figure 47A :</b> Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat MS1 sur milieu ISP4 et observé au microscope optique (Gr.x100) (à gauche) et (Gr.x400) (à droite) en microscopie électronique à balayage (G x 3800).....	116
<b>Figure 47B :</b> Observation au microscope électronique à balayage de l'isolat MS1 (Gr x 3800)..	116
<b>Figure 48</b> : Observation microscopique des trois isolats d'actinobactérie (Gr. x1000) après coloration de Gram.....	118
<b>Figure 49</b> : Résultat de l'antibiogramme des isolats D2, MS1 et C.....	120
<b>Figure 50</b> : Bandes de l'ADN 16S des Trois isolats d'actinobactéries révélées sur gel d'agarose après amplification par PCR.....	127
<b>Figure 51</b> : Séquence complète (5'---3') du gène d'ARN 16S de la souche MS1.....	127
<b>Figure 52</b> : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ARNr 16S montrant les relations entre l'isolat MS1 et les souches-types des espèces du genre <i>Streptomyces</i> .....	128

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 01.</b> Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries.....	7
<b>Tableau 02.</b> Principaux chimiotypes chez les actinobactéries (Larpent, 2000).....	13
<b>Tableau 03 .</b> Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les actinobactéries.....	14
<b>Tableau 04.</b> Clé d'identification des principaux genres d'actinobactéries basée sur les critères morphologiques et chimiques (Holt <i>et al.</i> , 1994).	16
<b>Tableau 05.</b> Habitats de certaines actinobactéries (Grigorova et Norris, 1990).....	31
<b>Tableau 06.</b> Des Séquences du génome total des espèces de <i>Streptomyces</i> disponibles dans des banques génomique.	43
<b>Tableau 07.</b> Travaux de séquençage du génome total de quelques espèces de <i>Streptomyces</i> ....	44
<b>Tableau 08.</b> Diminution de la production d'antibiotiques chez les actinobactéries par les sources de carbone rapidement assimilables (Chorin. 2009).	46
<b>Tableau 09.</b> Situation géographique des stations d'échantillonnage.....	50
<b>Tableau 10.</b> Caractéristiques des souches indicatrices.....	55
<b>Tableau 11.</b> souches bactériennes multi résistantes de référence utilisées dans ce travail.....	61
<b>Tableau 12.</b> Différents antibiotiques utilisés dans le test d'antibiogramme.....	70
<b>Tableau 13.</b> Séquences des amores utilisées en PCR.....	71
<b>Tableau 14.</b> Composition du mélange réactionnel de PCR.....	71
<b>Tableau 15 .</b> Conditions des réactions de PCR.....	71
<b>Tableau 16.</b> Nombre d'isolats d'actinobactéries isolés à partir des échantillons du sol.....	76
<b>Tableau 17.</b> Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries vis-à-vis des souches testées par la méthode de stries croisées.	82
<b>Tableau 18.</b> Diamètre d'inhibition de la croissance des souches de référence par les isolats.... d'actinobactéries (D2, MS1 et C)- technique de cylindre d'Agar.	85
<b>Tableau 19.</b> Zones d'inhibition (mm) des différentes phases organiques et aqueuses issues de l'extraction en utilisant les 04 solvants organiques, obtenues par la méthode des puits	90
<b>Tableau 20.</b> Révélation des activités antibiotiques des extraits organiques (différentes lots) de l'isolat D2 par antibiographie. (25 µl/ puits) ou bien (15 µl/disque) vis-à-vis des bactéries pathogènes.	92

<b>Tableau 21.</b> Révélation des activités antibiotiques des extraits organiques de l'isolat D2 par antibiographie. (25 µl/ puits) ou bien (15 µl/disque).	93
<b>Tableau 22.</b> Révélation des activités antibiotiques des extraits organiques de l'isolat D2 par antibiographie vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> multi résistantes.	94
<b>Tableau 23.</b> Chromatographie de l'extrait brut de l'isolat D2 sur CCM.....	95
<b>Tableau 24.</b> Résultats de l'activité des fractions majoritaires vis-à-vis de souche <i>S .aureus</i> de référence de type sauvage.	99
<b>Tableau 25.</b> Représente les paramètres de la méthode 1.....	101
<b>Tableau 26.</b> Composition des fractions recueillies en fonction du temps d'élution.....	102
<b>Tableau 27.</b> Paramètres des méthodes 1a-d (Méthode 1).....	104
<b>Tableau 28.</b> Paramètres de la méthode 2 de la purification de l'extrait brut.....	106
<b>Tableau 29.</b> Obtention des fractions par la méthode 2.....	107
<b>Tableau 30.</b> Résultats de l'analyse par spectroscopie de masse de fractions actives (ESI-MS / MS en mode positif).....	108
<b>Tableau 31.</b> Formules structurales probables du composé A.....	110
<b>Tableau 32.</b> Caractéristiques macromorphologiques des isolats d'actinobactéries sélectionnées après 21 jours d'incubation.	112
<b>Tableau 33.</b> Sensibilité des isolats d'actinobactéries aux différents antibiotiques.....	119
<b>Tableau 34.</b> Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats D2, MS1 et C.....	122
<b>Tableau 35.</b> Test de croissance des isolats actinobactéries sur le milieu ISP2 et à différentes températures, pH et concentrations du Na CL .....	124
<b>Tableau 36.</b> caractéristiques génomiques des deux souches D2 et MS1.....	132
<b>Tableau 37:</b> Résultat du blast initial des génomes des deux souches D2 et MS1.....	132
<b>Tableau 38:</b> Résultats de l'analyse de similarité par GGDC et par ANI pour la souche D2 et MS1.	132

## Liste des Chromatogrammes

<b>Chromatogramme 1.</b> Profil chromatographique de l'extrait brut de l'isolat D2 solubilisé dans du méthanol (colonne RP C18, gradient méthanol-eau 20-100% ; débit, 1.2 ml/min; détection, 220 et 254 nm).Fraction 5 en jaune (Rt = 6,45 min) et Fraction 8 en rouge (Rt = 15 :41 min).....	98
<b>Chromatogramme 2.</b> Fractions collectées en fonction de différentes couleurs. Les fractions D (jaune) et H (rouge) contenant des pics correspondant aux Rt du pic 5 et pic 8, précédemment identifiés comme fractions correspondant aux substances actives.....	102
<b>Chromatogramme 03.</b> Profil d'élution en HPLC de la fraction H purifiée.....	103
<b>Chromatogramme 04.</b> Comparaison des résultats obtenus avec la méthode 1a.....	104
<b>Chromatogramme 05.</b> Comparaison des résultats obtenus avec la Méthode 1b.....	104
<b>Chromatogramme 06.</b> Comparaison des résultats obtenus avec la Méthode 1c.....	104
<b>Chromatogramme 07</b> Comparaison des résultats obtenus avec les différents tests (Méthode 1d).	104
<b>Chromatogramme 08.</b> Chromatogramme obtenu à partir de la colonne d'analyse de l'échantillon A2. Les fractions jaune et rouge à collecter avec des Rt 6.651 min et 15,420 min respectivement.....	106
<b>Chromatogramme 09.</b> Séparation et collection des fractions avec la méthode 2.....	107

## Production scientifique

### I. Publications

**1/ Harir Mohamed**, Bellahcene Miloud, Fortas Zohra, José María García-Arenzana, Antonio Veloso, Susana Rodríguez-Couto. Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities. IJMCM Spring 2017, Vol 6, No 2.

**2/ Mohamed Harir**, Bellahcene Miloud, Fortas Zohra, Activités antimicrobiennes des Actinobactériens des zones arides et semi arides des régions : Adrar et M'sila (Algérie). Edition universitaire européennes ist ein imprint der/est une marque déposée de OmniScriptum GmbH et Co. KG Bahnhofstrabe 28,66111 Saarbruken , Deutschland / Allmagne. ISBN: 978-3-639-50298-5.

**3/ Harir Mohamed**, Bellahcene Miloud, Baratto Maria Camilla, Pollini Simona, Rossolini Gian Maria, Trabalzini Lorenza, Fatarella Enrico, Pogni Rebecca. Isolation and characterization of a novel tyrosinase produced by Sahara soil actinobacteria and immobilization on nylon nanofiber membranes.J Biotechnol. 2018 Jan 10;265:54-64.doi:10.1016/j.jbiotec.2017.11.004. Epub 2017 Nov 11.

**4/ Bendif H., Lazali, M., Harir, M., Miara, M. D., Boudjeniba, M. & Venskutonis, P. R.** (2017). Biological screening of *Ajuga iva* extracts obtained by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction. Journal of Medicinal Botany, 1, 33-41. doi: 10.25081/jmb.2017.v1.816.

## **II. Communications orales**

Bendif Hamdi, Miara Mohamed Djamel, **Harir Mohamed**, Bounar Rabah, Rebbas Khellaf, Boudjeniba Messaoud and Kameli Abdelkrim. Diversity in chemical compositions of essential oil and supercritical extracts of *teucrium polium* l. from Bordj Bou Arreridj (semi-arid zone in northeast of Algeria). Journée Internationale de la Biodiversité (**JIB2017**) : Diversité biologique et développement durable dans les zones arides et semi-arides d'Algérie.

## **III. Communications affichées**

**1/ Harir M.**, Bellahcene Miloud, Fortas Zohra. Antimicrobial activities of sharan actinobacteria strain The 11th International smoposium on phramaceutical sciences, 09-12 June 2015, Faculty of Pharmacy, Ankra University. Turkey. Antimicrobial activities of actinobacteria isolated from Algerian Sahara soils.

**2/ HARIR M.**, Baratto M.C., Basosi R. and Pogni R. Europeen Meeting on Oxizymes, 3, 6 July 2016 Wageningen, The Netherland: Purification and characterirization of new Tyrosinase produced by Saharan soil actinobacteria.

**3/ Harir M.**, Maria Camilla Baratto, Maher Al Khatib, Vazquez-Duhalt Rafael, Pogni Rebecca, Basosi Riccardo. 8<sup>th</sup> X EFEPR Conference Torino (Italie) 7, 9 September 2016, EPR investigations of enzyme-ligand complex in copper containing proteins. EPR investigations of enzyme-ligand complex in copper containing protein.

**4/**. Benmehaia R., Mahroug S., Seghiri S., Bendif H., **Harir M.** & Bahlouli F. dynamique de croissance racinaire de deux variétés d'abricotier (*Prunus armeniaca* l.) de la région de M'sila Journée internationale de la biodiversité (**JIB2017**) : Diversité biologique et développement durable dans les zones arides et semi-arides d'Algérie. 22 mai, 2017.

**5/**. Benmehaia R. , Mahroug S., Seghiri S., Bendif H., **Harir M.** & Bahlouli F. Architecture et dynamique de la croissance du système racinaire d'abricotier (*Prunus Armoniaca L*) séminaire internationale sur la valorisation des ressource naturelle dans la régions semi arides . Potentialités et perspectives d'Amélioration (VRVNZA 2016) 22-23 novembre 2016.

**6/** Bendif H., **Harir M.**, Khalfa H., Belghit S. Plantes aromatiques et médicinales de la région de Ben Srour (Sud Est de M'sila) : Biodiversité et valeur thérapeutique. Séminaire national sur les plantes Spontanées (SNPS 2017) 15/11/2017.

« Patience et longueur de temps font plus que force ni que rage.»

Jean de la Fontaine (**Les Fable s, Livre II, Fable 11**).

## Résumé

Ce travail consiste à apporter une contribution à l'étude du pouvoir antimicrobien de certaines actinobactéries ayant la capacité à inhiber la croissance des microorganismes pathogènes et par conséquent la recherche du composé actif au sein de leurs métabolites. Trente-deux (32) isolats d'actinobactéries ont été collectés à partir de six échantillons de sol, provenant de différentes régions d'Algérie. L'étude de l'activité antimicrobienne de ces isolats vis-à-vis de bactéries pathogènes Gram positif et Gram négatif, levures et champignons phytopathogènes par les techniques de stries croisées et des cylindres d'agar ont permis de sélectionner quatre isolats ayant une activité non négligeable : MS1, 10, C et D2. L'isolat D2 a présenté le plus important pouvoir inhibiteur antibactérien en particulier vis-à-vis des souches indicatrices *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus pneumoniae*, dont la zone d'inhibition peut atteindre 30 mm de diamètre. La molécule antimicrobienne de cet isolat a été extraite puis purifiée en utilisant différents solvants d'extraction dont l'acétate d'éthyle s'est révélé le meilleur solvant d'extraction. L'extrait brut a été testé sur plusieurs souches pathogènes y compris *S. aureus* afin d'étudier son spectre d'action. Le composé est ensuite purifié par CCM et HPLC semi préparative. La fraction active obtenue a été analysée par la méthode spectrométrique de masse ESI-Mass en mode positif et en mode négatif. En se référant à la base de données Streptome DB et selon la masse moléculaire et les propriétés de la molécule bioactive de l'isolat sélectionné, cette molécule semble être très proche des molécules 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3- (4-metilpentanoil) de phénanthrène-9,10-dione et Galvaquinone A avec quelques différences. Ce résultat laisse supposer qu'il s'agissait probablement d'un dérivé de l'une de ces molécules ou bien d'une nouvelle molécule. Les résultats de l'étude taxonomique, basés sur les caractères phénotypiques et phylogénétiques ont montré que l'isolat D2 est très proche génétiquement de *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877.

**Mots clefs :** Actinobactéries, molécules bioactives, *S. ambofaciens*, sols, activité antimicrobienne, étude taxonomique, séquençage de génome, *Staphylococcus aureus*, aride et semi aride, Galvaquinone A.

## Abstract

This work was designed to provide a contribution study of the antimicrobial ability of certain actinobacteria able to inhibit the growth of pathogen microorganisms, and thus to search the active compounds on behalf of their metabolites. Thirty-two actinobacterial isolates were collected from six soil samples from different regions of Algeria. The study of the antimicrobial activity of these isolates against pathogenic, Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts and phytopathogenic fungi by cross-streaking technics and agar cylinders leads to select four isolates having a non-negligible activity: MS1, 10, C and D2. The D2 isolate exhibited the greatest antibacterial inhibitory capacity, particularly against the strain indicator to the *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae*, whose the inhibition zone can reach 30 mm in diameter. The antimicrobial molecule of this isolate was extracted and then purified using different extraction solvents, in which ethyl acetate proved the best extraction solvent. The crude extract was tested on several pathogenic strains including *S. aureus* in order to study its spectrum of action. The compound was thereafter purified by CCM and HPLC. The obtained active fraction has been analyzed according to the method of mass spectroscopy ESI-Mass following positive and negative modes. By referring to the Streptome DB database and according to the molecular weight and properties of the bioactive molecule of the selected isolate, this molecule seems to be very close to the 1,8-dihydroxy-2-methyl-3- (4 -metilpentanoil) of phenanthrene-9,10-dione and Galvaquinone A along with some dissimilarities. This result suggests that it was probably a derivative of one of these molecules or a new molecule. The results of the taxonomic study, based on the phenotypic and phylogenetic characters showed that the D2 isolate is very genetically similar to *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877.

**Key words:** Actinobacteria, bioactive molecules, *S. ambofaciens*, soils, antimicrobial activity, taxonomic study, genome sequencing, *Staphylococcus aureus*, arid and semi arid, Galvaquinone A.

## ملخص:

هذا العمل يقتصر على المساهمة في دراسة القراءة لإنتاج المضادات الحيوية البكتيرية من طرف بعض الأكتينوبكتيريا التي لها القدرة على منع نمو الكائنات الحية الدقيقة المسئولة للأمراض وبالتالي البحث عن مركب فعال ضمن نواتج أيضها.

جمعت إثنان وثلاثون عزلة أكتينوبكتيريا من ستة عينات تربة من مناطق مختلفة من الجزائر. دراسة النشاط الحيوي ضد البكتيريا المسئولة للأمراض ذات الغرام الموجب والسلبي، خمائر وفطريات مسببة لأمراض النبات باستعمال تقنية الخطوط المتقطعة وتقنية أسطوانة الآجار سمحت لنا باختيار أربع عزلات (C. 10) D2.MS1.C اسفرت عن نشاط البكتيريا معتمد، مع تسجيل أشد نشاط لدى السلالة D2 خصوصا ضد السلالات المؤشرة *Streptococcus*، *Staphylococcus aureus et Bacillus pneumoniae*، *Staphylococcus aureus et Bacillus pneumoniae* بمساحة تثبيط تقارب 30 ملم (طول القطر). تم إستخلاص الجزيئة الحيوية المسئولة عن الخاصية المضادة للبكتيريا الممرضة لهذه العزلة وتنقيتها باستخدام مذيبات عضوية مختلفة و التي أثبتت أن إيثيل الأسيتات هو أفضل مذيب عضوي لاستخلاص هذا الجزيء المضاد للبكتيريا. تم اختبار المستخلص الخام ضد عدة سلالات ممرضة بما في ذلك *Staphylococcus aureus* لمعرفة مدى تأثيره.

قمنا بعد ذلك بتنقية المركب النشط باستعمال تقنية الفصل اللوني على الطبقة الرقيقة (CCM) وتقنية الفصل اللوني السائل عالي الأداء (HPLC). بعد ذلك تم تحليل الجزيء النشط المحصل عليه بواسطة طريقة الطيف الكتلي (spectroscopie de masse) (بالوضع الإيجابي و السلبي، ووفقاً للوزن الجزيئي و خواص الجزيئات النشطة ببولوجيا للعزلة المختارة D2 . واعتماداً على قاعدة البيانات Streptome DB ، أظهرت أن هذا الجزيء الفعال يبدو قريباً جداً من 1,8-dihydroxy-2-methyl-3-(4-metylpentanoil) of phenanthrene-9,10-dione et Galvaquinone ) (A) النشطة ببولوجيا مع بعض الاختلافات أو مشتق من هذه المركبات الفعالة أو يمكن أن يكون مركب جديداً.

بينت الدراسة التصنيفية المعتمدة على الخصائص المظهرية و الوراثية أثبتت أن السلالة المختارة D2 أقرب فصيلة وراثياً من السلالة Streptomyces ambofaciens ATCC 23877.

**الكلمات المفتاحية:** أكتينوبكتيريا ، المركبات الفعالة ، Streptomyces ambofaciens، *Staphylococcus aureus*, ATCC 23877 ، تربة ، النشاط الحيوي ضد الميكروبات ، الدراسة التصنيفية . قاحلة وشبه قاحلة A, Galvaquinone، تسلسل الجينوم،

# Introduction

## Introduction

Depuis des milliers d'années, les êtres humains utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des produits comme le pain, la bière, le fromage, etc. Ces microorganismes omniprésents dans notre environnement et dans certains aliments que nous consommons ne cessent d'occuper une place importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (**Smaoui, 2010**). Parmi les microorganismes présentant un intérêt biotechnologique, les actinomycètes ou bien les actinobactéries.

Ces actinobactéries sont des microorganismes procaryotes ayant un pourcentage de guanine-cytosine élevé (supérieur à 55%) qui les différencie des autres bactéries. En outre, elles forment phylogénétiquement une branche à part et sont caractérisées par une très grande diversité morphologique, pouvant aller de la forme cocci à la forme mycélienne parfaite (**Goodfellow, 2012**). Si la plupart des actinobactéries sont chimioorganotrophes, mésophiles, neutrophiles, non halophiles, cependant, il existe une diversité physiologique importante au sein de cette communauté microbienne puisque l'on retrouve également des thermophiles, des psychrophiles, des alcalophiles, des acidophiles, des halophiles et des fixateurs d'azote (**Goodfellow et al., 2012**). Cette grande diversité métabolique fait que les actinobactéries soient retrouvées dans divers environnement y compris les plus extrêmes (**Tiwari et Gupta, 2013**).

L'importance des actinobactéries a été soulignée dans divers domaines : industriel, médical et vétérinaire, ainsi que dans le domaine de l'agriculture et l'agro-alimentaire (**George et al., 2012; Solecka et al., 2012**). Les actinobactéries, surtout celles qui ont une structure mycélienne sont réputées pour la production d'antibiotiques, en particulier le genre *Streptomyces*. Ce dernier est considéré parmi les meilleurs candidats pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs. Ce genre bactérien est à l'origine d'environ 80 % de molécules actives produites à l'échelle industrielle pour les applications pharmaceutiques. Ce genre sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (**Solecka et al., 2012**) mais, aussi d'autres genres que l'on retrouve peu fréquemment ou parfois même rarement (**Tiwari et Gupta, 2011**). D'autres molécules bioactives sont également sécrétées par les actinobactéries telles que, les enzymes, les vitamines, les immunosuppresseurs, les insecticides (le Spinosad), les herbicides (anisomycine) (**Genilloud et al., 2011**).

Si la plupart des actinobactéries sont utiles, certaines sont pathogènes pour l'homme et les animaux ou encore pour les plantes (**Locci, 1994 ; McNeil et Brown, 1994 ; Solecka et al., 2012**).

Les chercheurs s'évertuent à isoler perpétuellement de nombreuses souches d'actinobactéries de divers milieux, surtout des milieux où les conditions de vie sont très difficiles (sols salés, sols alcalins, sols acides, marais salants, sols pollués par du pétrole ....), dans l'espoir de découvrir de nouveaux taxons et également de nouvelles molécules bioactives ayant des activités intéressantes (**Solecka et al., 2012**). Parmi les molécules bioactives les plus recherchées, les antibiotiques et les enzymes (**Lopes et al., 1999**).

En Algérie, la majorité des travaux de recherches effectués sur les actinobactéries sont axés principalement sur la recherche de molécules antimicrobiennes à l'exception de quelques recherches orientées vers l'étude des enzymes telles que les peroxydases extracellulaires des *Streptomyces* (**Fodil et al., 2012**) et la kératinase thermophile de *Streptomyces* (**Hebbache et al., 2014**).

Les enzymes sont des molécules bioactives très utiles utilisées dans la dégradation des biomasses végétales et animales, dans l'industrie alimentaire et en biologie moléculaire. Parmi ces enzymes produites par les actinobactéries : la cellulase, la xylanase, la peroxydase, la laccase et la tyrosinase (**William et al., 1993 ; le Rose Hill et al., 2015 ; Harir et al, 2017**).

L'utilisation des composés chimiques de synthèse tels que les antibiotiques reste le principal moyen de lutte thérapeutique contre les agents pathogènes. Cependant, suite à l'apparition et l'extension rapide du phénomène de résistance des souches aux antibiotiques, les rendant inefficaces ; ces dernières décennies des travaux se sont orientés vers la recherche de nouvelles molécules ayant un spectre d'activité importante. La recherche des actinobactéries productrices de molécules bioactives se fait par des screening, parfois à grande échelle pour espérer obtenir des souches sécrétant des composés intéressants et capables de faire face à la résistance de plus en plus croissante et inquiétante des microorganismes pathogènes aux antibiotiques, phénomène qui a pris de l'ampleur durant ces dernières années (**Huttner et al., 2013**). Généralement, le screening des isolats performants se réalise à l'aide de méthodes classiques : méthodes des stries croisées, cylindres d'agar, double couche...). Parallèlement à ce genre d'actinobactérie (*Streptomyces*), considéré comme le plus dominant au sein des actinobactéries, il existe d'autres genres tels que *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*,

*Nonomuraea*, etc., ayant déjà montré un grand potentiel de production de molécules bioactives intéressantes sur le plan médical (**Genilloud et al., 2010; Flatt et al., 2013; Nakae et al., 2013**).

En Algérie, les sols sahariens et semi-arides se sont révélés très diversifiés en actinobactéries. De nombreux travaux ont été publiés sur la taxonomie de ces microorganismes, dans le but i /de découvrir de nouvelles espèces (**Zitouni et al., 2004; Boubetra et al. 2013 et 2015; Aouiche et al., 2015; Bouras et al., 2015**), ou ii /de mettre en évidence une activité antimicrobienne (**Boughachiche et al., 2012; Boubetra et al., 2013; Aouiche et al., 2014; Toumatia et al., 2014; Driche et al., 2015; Yekkour et al., 2015**). Par ailleurs, plusieurs souches d'actinobactéries provenant de différents sols ont déjà montré leur utilisation potentielle comme agents antagonistes, produisant de molécules antimicrobiennes (**Lamari et al., 2002a,b; Zitouni et al., 2004 et 2005; Badji et al., 2005; 2006 et 2007; Merrouche et al., 2010; Boubetra et al., 2012**). Notre étude s'inscrit dans cette thématique afin d'isoler et de sélectionner des souches d'actinobactéries performantes et productrices de molécules antimicrobiennes.

Ce travail de recherche, réalisé au sein du Laboratoire de Biologie des Micro-organismes et Biotechnologie (LBMB) - Université Ahmed Ben Bella Oran 1 et au laboratoire de Biophysique à l'université de Siena- Italie, est centré sur les actinobactéries caractérisées par leur aptitude à sécréter des antibiotiques.

Ce travail de thèse est présenté en quatre chapitres :

Dans une première partie, nous présentons une mise au point bibliographique décrivant les notions essentielles à la compréhension de notre travail (taxonomie des actinobactéries, micro-organismes producteurs d'antibiotiques et description des méthodes d'identification des actinobactéries et des principales molécules produites). La seconde décrit la partie expérimentale avec une présentation des techniques d'isolement, d'identification et de sélection de souches antagonistes vis-à-vis de bactéries pathogènes et toxinogènes, levures et champignons. La troisième partie consiste à l'optimisation des conditions de production des biomolécules antimicrobiennes de la souche productrice d'antibiotique ainsi que sa purification et la caractérisation chimique de la molécule antimicrobienne. La quatrième est dernière partie est consacrée à l'identification moléculaire de l'isolat D2 productrice d'antibiotique ainsi que l'isolat MS1 productrice d'enzyme (tyrosinase), à l'aide d'outils moléculaires par l'analyse du génome totale. Enfin, le manuscrit se termine par une conclusion qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail.

# **Chapitre I**

# **Revue Bibliographique**

## **Chapitre I : Revue Bibliographique**

### **I. Les Actinobactéries**

#### **1. Historique**

Les actinobactéries ont été isolés pour la première fois par Cohn en 1875 à partir de sources humaines (**Williams et al., 1984**). Et c'est en 1943 que Waksman a pu isoler un genre d'actinobactéries à partir du sol. Ce même auteur divise en quatre grandes périodes, l'histoire des actinobactéries. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie, et va de 1874 aux années 1890. La seconde période allant de 1900 à 1919 se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinobactéries du sol, avec les travaux de kraisky, de Cohn, de Waksman et de Curtis. Ensuite, la période de 1919 à 1940 au cours de laquelle, une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de Waksman, de Lieske, de Krassilinkov. La dernière époque allant de 1940 à ce jour est celle des antibiotiques produits par les actinobactéries. On peut noter les travaux de Professeur Sabaou Nasser Eddine en Algérie (**1980**) et ses collaborateurs.

#### **2. Définition des actinobactéries**

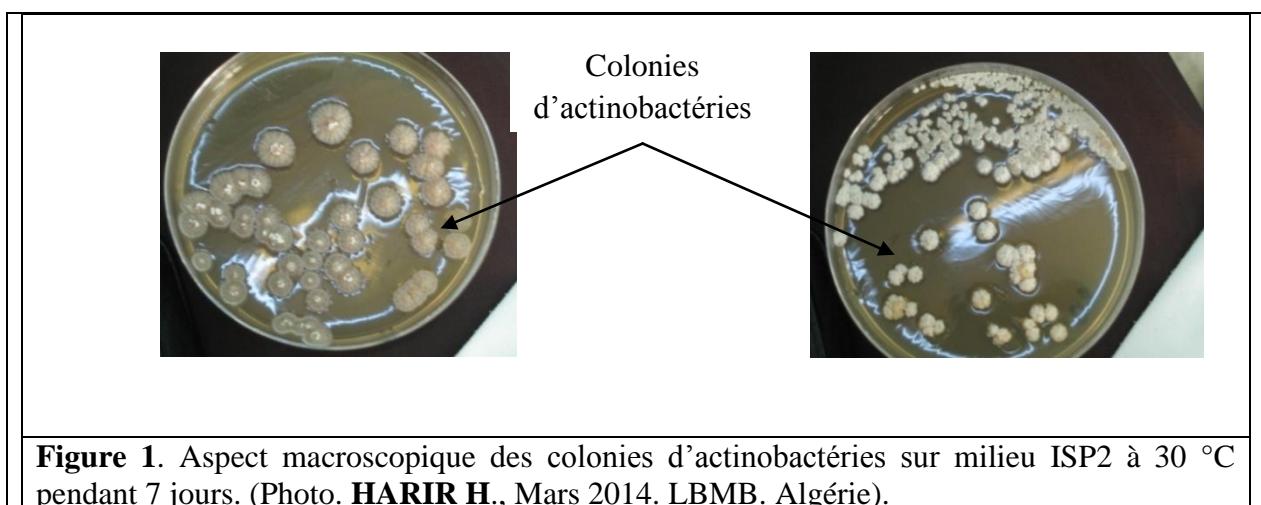
Etymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs «Aktis» qui veut dire rayon et «mykes» qui veut dire champignon «Champignons à rayons» ou «Champignons rayonnants» (**Lamari, 2006**). Les actinobactéries ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignons. Actuellement, ils sont reconnus comme des organismes procaryotes. Pourtant, ces micro-organismes présentent des similitudes à la fois avec les bactéries et avec les champignons (**Andriambololona, 2010**). Les actinomycètes, également connus sous le nom des actinobacteria (**Perry et al., 2004**), sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires et à une morphologie complexe (**Colombié, 2005 ; Eunice et Prosser, 1983**). Elles sont constituées d'hyphes c'est-à-dire des filaments qui irradiient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance, (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et Prosser, 1983**).

Les actinobacteries constituent l'ordre des actinomycétales. Ce sont des bactéries saprophytes formant des filaments minces et ramifiés, septées, bacilles à Gram positif (**Dgigal, 2003**); possédant un coefficient de Chargaff (GC%) élevé compris entre 60-70% (**Larpent, 1989**). La plupart des espèces sont immobiles, hétérotrophes mais certaines sont chimio-autotrophes (**Ensign et al., 1993**), aérobies, mésophiles et poussent de façon optimale

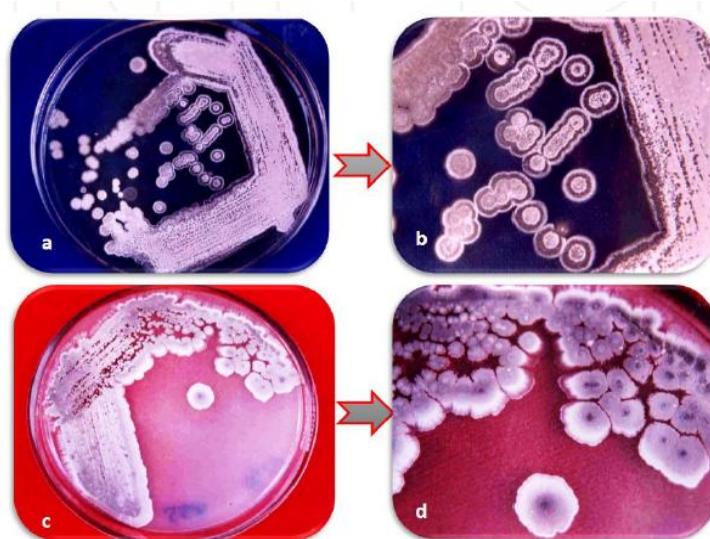
dans une gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité (Williams et Wellington, 1982 a ; Goodfellow et Williams, 1983).

### 3. Caractéristique générale d'actinobactéries

Les actinobactéries comprennent un groupe de micro-organismes unicellulaires ramifiés, dont la plupart sont aérobies formant des mycéliums connus sous le nom mycélium de substrat et aérien. Ils se reproduisent par fission binaire ou par production de spores ou de conidies. La sporulation des actinobactéries se fait à travers la fragmentation et la segmentation ou bien la formation de conidies. L'apparence morphologique des actinobactéries est compacte, souvent coriace, donnant un aspect conique avec une surface sèche sur les milieux de culture et souvent couverte par le mycélium aérien (**Figure 1 et 2**).



**Figure 1.** Aspect macroscopique des colonies d'actinobactéries sur milieu ISP2 à 30 °C pendant 7 jours. (Photo. **HARIR H.**, Mars 2014. LBMB. Algérie).



**Figure 2.** Actinobactéries isolées sur milieu amidon caséine agar après incubation à 30 °C /14 jours (a, c : Photos des boîtes de Pétri des isolats d'actinobactéries). (b, d : Morphologie des colonies individuelles) (**Ananda, 2016**).

## II. Taxonomie et critères de classification des actinobactéries

### 1. Systématique des actinobactéries

Les différentes éditions du Manuel de Bergey ont apporté des définitions actualisées des actinobactéries avec des données fournies par des travaux récents par rapport à l'époque de chaque édition. Selon la classification du "Taxonomic Outline of The Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Deuxième édition 2004 (**Garrity et al., 2004**), le **Phylum Actinobacteria** ( bactéries à Gram positif et % G +C élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également "*Actinobacteria*". Celle-ci a été décrite par **Stackebrandt et al. (1997)**. Selon le **Bergey's Manual de 2012**, la définition des actinobactéries est restée la même (bactéries à Gram positif ayant un % G+C supérieur à 55% et présentant une grande variabilité morphologique, la plupart étant mycéliens). Mais sur la base des données de la biologie moléculaire notamment le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S, la classification supragénérique des actinobactéries a subi un profond remaniement. Ces microorganismes sont classés actuellement dans le règne des *Prokaryotae*, le phylum des *Actinobacteria* et la classe des *Actinobacteria* également.

Cependant, l'ordre des *Actinomycetales* a été subdivisé en plusieurs ordres (*Actinomycetales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Micromonosporales*, *Micrococcales*, etc). L'ordre des *Actinomycetales* actuellement est un petit ordre regroupant peu de genres, dont *Actinomyces*. Ce dernier représente le genre anaérobie strict et pathogène pour l'homme. Les *Actinobacteria* sont classées, depuis 2012, dans 15 ordres, 43 familles et 203 genres, dont les plus répandus sont présentés dans le **Tableau 1**, (**Goodfellow et al., 2012 in Bergey's Manual, 2012**).

### 2. Evolution des critères d'identification

La systématique bactérienne a subi plusieurs modifications durant les trois dernières décennies dues à l'application de nouvelles techniques biochimiques, chimiques, génétiques, numériques et moléculaires (**Abbas, 2006**). Cette évolution fut marquée par quatre périodes essentielles dont chacune a apporté de nouveaux critères de classification.

Lors de la première période, seuls les critères macro- et micro-morphologiques permettaient de distinguer les différents genres entre eux. Cette période s'est étendue jusqu'au début des années 60, (**Pridham et al., 1958; Tresner et al., 1961, in Zitouni, 2005**).

La seconde période qui a débuté à partir des années 60, a vu le développement de la chimiotaxonomie est basée sur l'analyse des constituants cellulaires tels les acides aminés

(Becker *et al.*, 1964 ; Staneck et Roberts, 1974), les sucres cellulaires (Lechevalier et Lechevalier, 1970a).

**Tableau 1.** Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries (Goodfellow *et al.*, 2012).

Classes	Ordres	Familles
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
	<i>Actinopolysporales</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>
	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
	<i>Catenulisporales</i>	<i>Catenulisporaceae, Actinospicaceae</i>
	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae, Dietziaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Segniliparaceae, Tsukamerullaceae</i>
	<i>Frankiales</i>	<i>Frankiaceae, Acidothermaceae, Cryptosporangiaceae, Geodermatophilaceae, Nokamurellaceae</i>
	<i>Glycomycetales</i>	<i>Glycomycetaceae</i>
	<i>Jiangellales</i>	<i>Jiangellaceae</i>
	<i>Kineosporales</i>	<i>Kineosporaceae</i>
	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae, Beutenbergiaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabacteriaceae, Dermacoccaceae, Dermatophilaceae, Intrasporangiaceae, Jonesiaceae, Micobacteriaceae, Promicomonosporaceae, Rarobacteriaceae, Ruaniaceae</i>
<i>Acidimicrobia</i>	<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae, Nocardioidaceae</i>
	<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
	<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
	<i>Streptosporangiales</i>	<i>Streptosporangiaceae, Nocardiopcaceae, Thermomonosporaceae</i>
<i>Nitriliruptoria</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Actinomicrobiaceae</i>
<i>Rubrobacteria</i>	<i>Nitriliruptorales</i>	<i>Nitriliruptoraceae</i>
	<i>Euzebyales</i>	<i>Euzebyaceae</i>
	<i>Rubrobacteriales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>
<i>Thermophilia</i>	<i>Thermophilales</i>	<i>Thermophilaceae</i>
	<i>Solirubrobacteriales</i>	<i>Solirubrobacteraceae, Conexibacteraceae, Patulibacteraceae</i>

Il en est de même pour l'analyse des lipides membranaires et pariétaux tels que les acides mycoliques (Mordarska *et al.*, 1972; Minnikin *et al.*, 1977), les phospholipides (Lechevalier *et al.*, 1977 ; Minnikin *et al.*, 1977), les ménaquinones et les acides gras (Grund et Kroppenstedt, 1990). La chimiotaخمie combinée aux critères morphologiques fut d'un apport essentiel dans la différenciation de nouveaux genres.

La troisième période qui a débuté dans les années 70, avec une apogée entre 1980 et 1990 combine l'outil informatique aux tests physiologiques. La taxonomie numérique basée sur des tests physiologiques analysés par ordinateur grâce à des logiciels adéquats a permis d'apporter beaucoup de clarté (**Grund et Kroppenstedt, 1990**).

Bien que les résultats obtenus étaient assez concluants, les taxonomistes abandonnèrent ces critères au profit des critères moléculaires, beaucoup plus performants. La dernière période, fut celle de l'application des méthodes d'analyse génétiques et moléculaires, qui ont débuté durant les années 80. Plusieurs techniques ont été utilisées, telles que l'hybridation ADN-ADN, la détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de guanine - cytosine), le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et 23S, etc.

### **3. Critères actuels d'identification**

La systématique des actinobactéries est basée actuellement sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et génétiques. Certains genres sont facilement identifiables par leur micromorphologie particulière, comme les *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora*. En revanche, dans la plupart des autres cas, la détermination des chimiotypes est indispensable. Citant à titre d'exemple, les genres *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nomonuraeae*, *Saccharopolyspora*, *Nocardiooides*, *Streptomyces* (à un degré moindre).

Les caractères physiologiques et surtout génétiques sont indispensables pour une identification fiable et précise des espèces et sous-espèces (**Sabaou et al., 1980**).

#### **3.1. Caractères morphologiques**

Les critères morphologiques font appel aux caractéristiques culturales sur différents milieux de culture et aux caractéristiques micromorphologiques (**Shirling et Gotlieb, 1966**).

##### **3.1.1. Caractéristiques culturales ou macromorphologiques (Bouras et al., 2008)**

Il s'agit alors de noter :

- la présence ou l'absence de mycélium aérien (MA).
- la couleur du MA et du mycélium du substrat (MS).
- la production et la couleur des pigments diffusibles.
- la production ou non de pigments mélanoïdes.

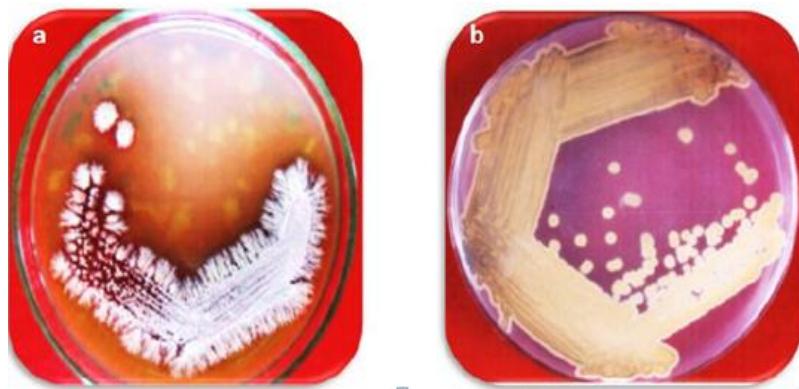
Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs.

### 3.1.1.1. Mycélium aérien

Le mycélium aérien est habituellement plus épais que le mycélium du substrat. Il montre une différenciation suffisante selon laquelle plusieurs isolats peuvent être séparés en un certain nombre de groupes ayant des caractéristiques morphologiques similaires dans des conditions bien précise. Ceci est désigné comme l'un des critères les plus importants pour la classification du genre *Streptomyces* en espèces, comprenant une structure (cotonnière, veloutée ou en poudre), une formation d'anneaux ou de zones concentriques et de pigmentation (**Figure 3 a**).

### 3.1.1.2. Mycélium de Substrat

Le mycélium de substrat d'actinobactéries a différentes tailles, formes et épaisseurs. Sa couleur varie de blanc ou pratiquement incolore à jaune, marron, rouge, rose, orange, vert ou noir (**Figure 3**).



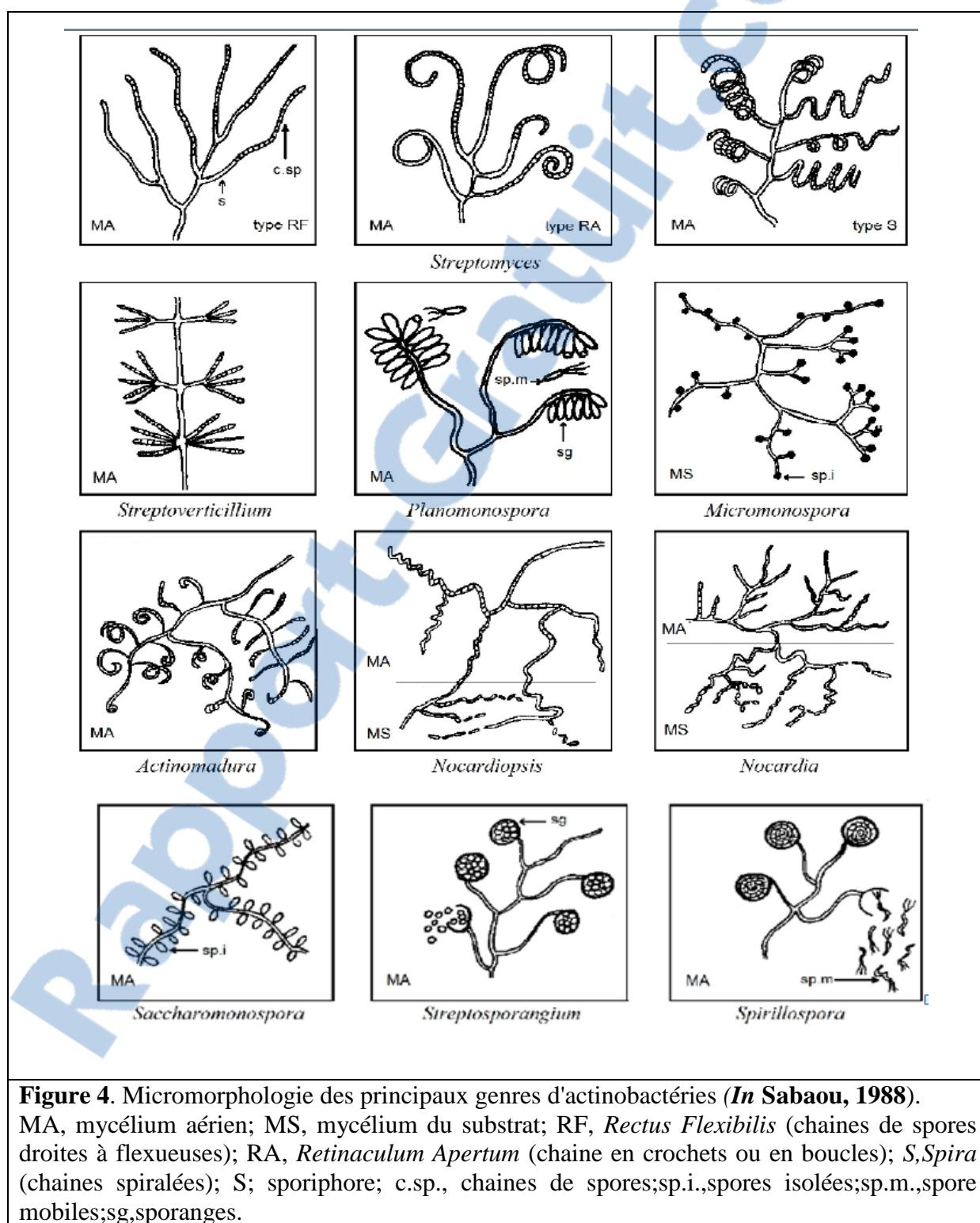
**Figure 3.** Croissance d'un isolat d'actinobactérie sur milieu agar de caséine et amidon. .a. mycélium aérien. b. mycélium de substrat (**Ananda, 2016**).

### 3.1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les critères micro morphologiques importants selon (**Bouras, 2006**) et (**Boudjella, 2007**) Sont :

- La fragmentation on non du MS ;
- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur la MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaines) ; la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue : **Figures 4, 5 et 6**).
- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores.

- La présence de spores mobiles (ex : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres.) ;
- La formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou de structures spéciales telles que les synnemata (*Actinosynnema*), les scléroties, etc...



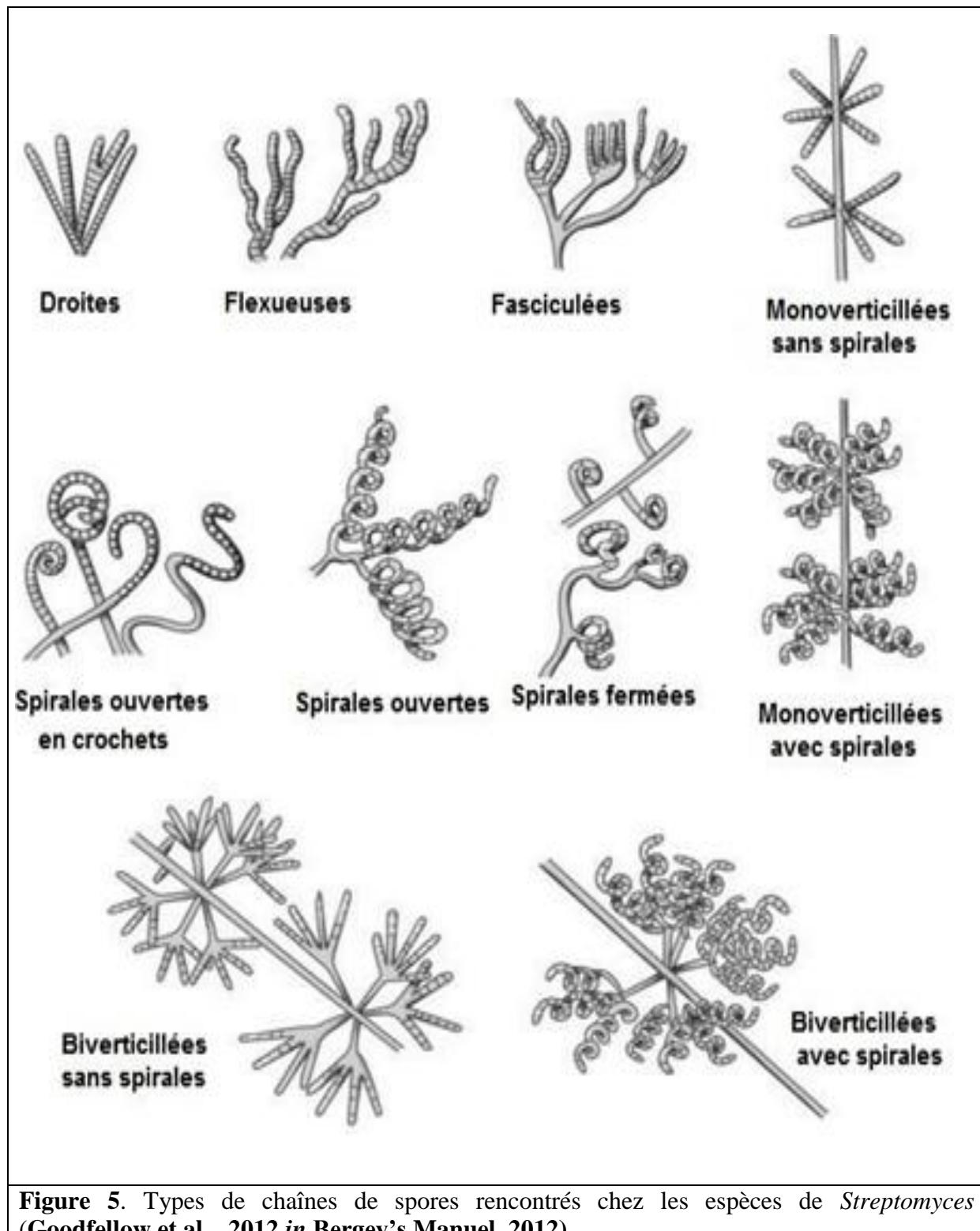


Figure 5. Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de *Streptomyces* (Goodfellow et al., 2012 in Bergey's Manuel, 2012).



**Figure 6.** Mycélium du substrat avec des chaines de spores de *Streptomyces* sur le milieu Amidon-Caséine incubée à 32°C /7 jours (**Srivibool et Sukchotiratana, 2004**).

### 3.2-Caractères chimiotaxonomiques (chimiotaxonomie)

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie.

#### 3.2.1. Constituants pariétaux : isomères de l'acide diaminopimélique et acides aminés

En fonction des genres d'actinobactéries, l'acide diaminopimélique pariétal peut se présenter sous forme isométrique LL ou DL, ou encore être remplacé par d'autres acides aminés tels que la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique. La glycine est aussi un acide aminé taxonomiquement important présent chez certains genres (**Holt et al., 1994**).

#### 3.2.2. Glucides

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs. Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinomadura* et *Streptosporangium*. Les *Streptomyces* et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des *Actinoplanes* et du genre *Micromonospora*. (**Lechevalier et Lechevalier, 1970a**).

Les sucres non caractéristiques (n'ayant pas d'importance taxonomique) sont le glucose, le ribose, le mannose et le galactose (quand celui-ci n'est pas couplé à l'arabinose et à la xylose).

Les actinobactéries ayant les chimiotypes V, VI, VII et VIII ne produisent pas un véritable mycélium. Ils se présentent sous forme de cellules en bâtonnets ou coccoïdes, ou parfois avec un mycélium très rudimentaire.

**Tableau 2.** Principaux chimiotypes chez les actinobactéries (**Larpent, 2000**).

Chimiotype	acides aminés	sucres caractéristiques	Genre
Type IC	LL-DAP, Glycine	pas de sucres caractéristiques	<i>Streptomyces, Nocardiooides</i>
Type IID	DL-DAP	glycine, arabinose, xylose	<i>Actinoplanes, Micromonospora</i>
Type IIIB	DL-DAP	madurose	<i>Streptosporangium, Actinomadura</i>
Type IIIC	DL-DAP	pas de sucres caractéristiques	<i>Thermomonospora, Nocardiopsis</i>
Type IIIE	DL-DAP	galactose, Rhamnose	<i>Saccharothrix, Actinosynnema</i>
Type IVA	DL-DAP	arabinose, galactose	<i>Nocardia,</i> <i>Amycolatopsis, Pseudonocardia</i>
Type V	lysine, ornithine	pas de sucres caractéristiques	<i>Actinomyces</i>
Type VI	lysine,	pas de sucres caractéristiques	<i>Oerskovia, Promicromonospora</i>
Type VII	glycine, DAB	pas de sucres caractéristiques	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
Type VIII	ornithine	pas de sucres caractéristiques	<i>Aureobacterium, Curtobacterium</i>

Note : DAP = acide diaminopimélique. DAB = acide diaminobutyrique.

### 3.2.3. Constituants membranaires et pariétaux : lipides

Il existe des genres qui sont très différents mais qui possèdent le même chimiotype. Pour les distinguer chimiquement, d'autres analyses chimiques concernant la composition de la membrane et de la paroi en lipides sont nécessaires. Les lipides qui sont taxonomiquement importants sont les suivants :

#### 3.2.3.1. Les phospholipides

La composition membranaire en phospholipides est l'un des caractères les plus importants. Elle permet de distinguer entre eux la plupart des genres ayant le même chimiotype. En fonction de cette composition, **Lechevalier et al. (1977)** ont divisé les actinobactéries en 5 types de phospholipides : PI à PV (**Tableau 3**).

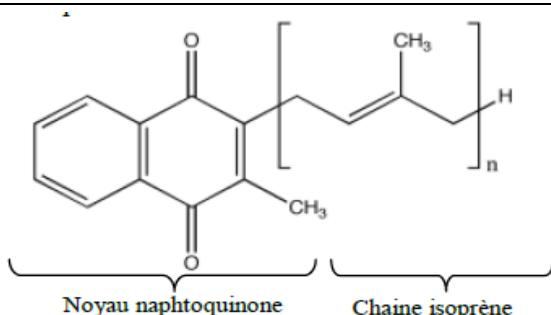
**Tableau 3.** Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les *Actinobacteria* (selon Lechevalier *et al.*, 1977).

Type de phospholipides	PE	PC	PG	PGI	Exemples
<b>PI</b>	-	-	-	<b>V</b>	<i>Actinomadura</i> .
<b>PII</b>	+	-	-	+	<i>Streptomyces, Pseudonocardia</i> .
<b>PIII</b>	-	+	-	<b>V</b>	<i>Nocardiopsis, Amycolatopsis</i> .
<b>PIV</b>	+	-	+	-	<i>Nocardia, Nomonuraea</i> .
<b>PV</b>	-	-	+	+	<i>Oerskovia</i> .

PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, PG : phospholipides contenant la glucosamine, PGly : phosphatidylglycérol. V : variable : (+/-).

### 3.2.3.2. Les ménaquinones

Ce sont des lipides solubles situés au niveau de la membrane plasmique et ayant un rôle important dans la respiration. Elles sont impliquées dans le processus de transport des électrons et la phosphorylation oxydative. Leur structure est faite d'un noyau naphtoquinone méthylé (2-méthyl-1,4-naphtoquinone) lié à une chaîne latérale isoprénique (**Figure 7**). Elles sont différenciées en fonction du nombre des unités isopréniques et du degré d'hydrogénéation de la chaîne (Minnikin *et al.*, 1984; Rodríguez Concepción et Boronat, 2013). La composition membranaire en ménaquinones représente un complément de confirmation des résultats déjà obtenus. Elle n'est obligatoire que lors de la description de nouvelles espèces.



**Figure 7.** Structure générale des ménaquinones (Rodríguez Concepción et Boronat, 2013).

### 3.2.3.3. Acides gras

Les acides gras les plus communs, chez les actinobactéries appartiennent soit au groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone. La présence d'acides mycoliques est caractéristique des genres tels que *Nocardia*, *Mycobacterium* et *Rhodococcus* (Larpent et Larpent Gourgaud, 1985).

La composition membranaire en acides gras, représente aussi une donnée complémentaire permettant dans certaines situations de distinguer certains genres entre eux (**Minnikin et al., 1984; Kroppenstedt et al., 1990**). Cette analyse reste obligatoire lors de la description de nouvelles espèces.

### **3.2.3.4. Les acides mycoliques**

La recherche des acides mycoliques concerne seulement les actinobactéries appartenant au chimiotype IVA qui sont distingués entre eux en fonction de leur présence ou de leur absence. Les acides mycoliques sont des lipides pariétaux complexes et insaturés (**Mordarska et al., 1972**). Ainsi, dans ce groupe (chimiotype IV A), *Nocardia* (ayant des acides mycoliques) a été séparé d'*Amycolatopsis* et de *Pseudonocardia* (n'ayant pas d'acides mycoliques), ces derniers étant différenciés entre eux par la composition en phospholipides.

## **3.3. Critère physiologique et taxonomie numérique**

Les tests physiologiques utilisés consistent en des tests de dégradation de différents composés organiques (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents), ainsi que la tolérance au pH, à la température, à la salinité, etc. Lorsque les tests physiologiques sont très nombreux, les résultats deviennent difficilement exploitables. Ce qui a amené les systématiciens à appliquer durant une longue période la taxonomie numérique aux actinobactéries (**Goodfellow et al., 1990**). Cette technique a apporté plus de clarté dans la reconnaissance des espèces et les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus sur le genre *Streptomyces*. En effet, le nombre d'espèces de ce genre, qui était de 463 a été réduit à 142 (**Williams et al., 1989**). Le **Tableau 04** montre la clé d'identification des principaux genres d'actinobactéries basée sur les critères morphologiques et chimiques.

**Tableau 4.** Clé d'identification des principaux genres d'actinobactéries basée sur les critères morphologiques et chimiques (**Holt et al., 1994**).

Caractéristiques morphologiques	Caractéristiques chimiques							Genres
	DAP	Glycine	Sucres	Chimiotype	Acides mycoliques	Phospholipides (P)	Ménaquinones (MK)	
Présence ou non de MA et micromorphologie								
Chaînes de spores sur MA	LL	+	C	C	-	PII	MK9 (H6,H8)	<i>Streptomyces</i>
MA et MS fragmentés	LL	+	NC	IC	-	PI	MK8 (H4)	<i>Nocardiooides</i>
MA (-), sporanges sur MS avec une spore	LL	+	N	IC	-	PIII	MK9 (H4)	<i>Kineosporia</i>
MA ((-)), spores isolées sur MS	DL	+	xyl.-arab.	ID	-	PII	MK9 (H4),10(H4)	<i>Micromonospora</i>
MA (-), chaînes de spores sur MS	DL	+	// //	IID	-	PII	MK9 (H4),10(H8)	<i>Catellatospora</i>
MA (-), sporanges globuleux avec nombreuses spores mobiles	DL	+	// //	IID	-	PII	MK9 (H4),10(H4)	<i>Actinoplanes</i>
MA (-), sporanges en massue avec peu de spores mobiles	DL	+	// //	IID	-	PII	MK9 (H4,H6,H8)	<i>Dactylosporangium</i>
MA (-), chaînes de spores non mobiles	DL	+	// //	IID	-	P	MK9 (H4), 10(H4)	<i>Glycomyces</i>
MA (+), 2 à 15 spores par chaîne sur MA	DL	-	madurose	IIIB	-	PI	MK9 (H6)	<i>Actinomadura</i>
MA (+), spores agencées par 2 sur MA	DL	-	/	//	-	PIV	MK9 (H2,H4,H6)	<i>Microbispora</i>
MA (+), 2 à 15 spores par chaîne sur MA	DL	-	/	//	-	PIV	MK9 (H0,H2,H4)	<i>Nonomuraea</i>
MA (-), 10 à 30 spores par chaîne au dessus du MS	DL	-	/	//	-	PIV	MK10 (H4)	<i>Herbidospora</i>
MA (+), sporanges avec une spore mobile sur MA	DL	-	/	//	-	PIV	MK9 (H2)	<i>Planomospora</i>
MA (+), sporanges avec deux spores mobiles sur MA	DL	-	/	//	-	PIV	MK9 (H2,H4)	<i>Planobispora</i>
MA (+), sporange avec nombreuses spores non mobiles	DL	-	/	//	-	PIV	MK9 (H2,H4)	<i>Streptosporangium</i>
MA (+), sporange avec nombreuses spores mobiles sur	DL	-	/	//	-	PI, PII	MK9 (H4,H6)	<i>Spirillospora</i>
MA(+), MA et MS fragmentés	DL	-	Arab.-gal.	IVA	+	PII	MK8 (H4),9(H2)	<i>Nocardia</i>
MA (-), cycle mycélium-batonnet-cocci	DL	-	// //	//	+	PII	MK8 (H4),9(H2)	<i>Rhodococcus</i>
MA (+), MA et MS fragmentés	DL	-	// //	//	-	PII	MK9 (H2,H4)	<i>Amycolatopsis</i>
MA (+), spores isolées sur MA	DL	-	// //	//	-	PII	MK9 (H4)	<i>Saccharomonospora</i>
MA (+), chaînes de spores sur MA	DL	-	// //	//	-	PIII	MK9 (H4)	<i>Saccharopolyspora</i>
MA (+), chaînes de spores anarchique sur MA et MS	DL	-	Rham.-gal.	IIIIE	-	PII, PIV	MK9 (H), 10(H4)	<i>Saccharothrix</i>
MA (+), chaînes de spores anarchique sur MA et MS	DL	-	NC	IIC	-	PIII	MK10 (H2,H4,H6)	<i>Nocardiopsis</i>
MA (+), spores isolées sur MA	DL	-	NC	IIIC	-	PII, PIV	MK9 (H2,H4), 10(H4,H6)	<i>Thermomonospora</i>

Note: DAP, acide diaminopimélique; NC, non caractéristique; ND, non déterminé; **arab.**, arabinose; **gal.**, galactose; **Rham.**, rhamnose, **xyl.**, xylose; **MA**, mycélium aérien; **MS**, mycélium du substrat. Phospholipides : **PI**, pas de phospholipides azotés ; **PII**, présence de phosphatidyléthanolamine (PE) ; **PIII**, présence de phosphatydylcholine; **PIV**, présence de PE et de phospholipides avec glucosamine (PG); **PV**, **PG** avec phosphatidylglycérol. Ménaquinones prédominants (= MK): exemple MK9 (H4) = ménaquinones

### **3.4. Critères moléculaires**

Depuis que la biologie moléculaire a fait son apparition, vers le début des années 1980, les tests de routine commencent lentement à être remplacés par les techniques moléculaires. Grâce à la biologie moléculaire, plusieurs alternatives sont maintenant possibles dans un délai de quelques jours seulement à comparer à quelques semaines avec les méthodes traditionnelles. Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, nous citons l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%), ainsi que l'analyse des séquences des protéines ribosomiques. La fiabilité et la rapidité d'exécution de ces techniques ont ainsi permis de réviser la phylogénie des actinobactéries (**Stackebrandt et Woese, 1981; Stackebrandt et al., 1997; Rheims et al., 1999**).

#### **3.4.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S et phylogénie**

Il s'agit du séquençage de gène codant pour l'ARN ribosomique de la sous unité 16S (désigné par le terme “ADNr 16S”). L'intérêt pour ce gène chromosomique, d'environ 1500 paires de base, présent chez toutes les bactéries, repose d'une part, sur son important polymorphisme à l'échelle inter-espèces et d'autre part, sur la présence de séquences de 15 paires de base aux deux extrémités de ce gène qui sont conservés chez tous les procaryotes. Ainsi, ces caractéristiques sont idéales pour la conception d'amorces génériques extensibles par PCR et dont les produits (ADNr 16S) sont séquencés puis comparés, afin d'établir la phylogénie des microorganismes-sources. En effet, les séquences obtenues sont comparées avec des séquences de références disponibles dans les banques génomiques libres sur internet telles que « EzTaxon », qui regroupe les séquences de toutes les souches-types validées des bactéries. Cette comparaison nécessite un traitement préalable des séquences nucléotidiques partielles obtenues en général, après séquençage et reconstitution de la séquence complète (ou presque complète) de l'ADNr 16S. Ce traitement utilise des outils d'alignement de séquences tels que « Clustal W et Muscle » (**Jukes et Cantor., 1969**) et de comparaison avec les banques génomiques tels que « Blast ».

Ainsi, le séquençage de l'ADNr 16S constitue un outil très rapide pour l'identification des taxa. Il faut cependant noter qu'un taux d'homologie compris entre 97% et 100% n'indique pas nécessairement que l'espèce soit identique, surtout si cette dernière fait partie d'un genre comptant un grand nombre d'espèces comme c'est le cas pour le genre *Streptomyces*. Le recours à l'hybridation ADN-ADN, ou bien le séquençage de génome total s'avère donc nécessaire pour statuer définitivement sur des cas pareils (Groupe non résolu).

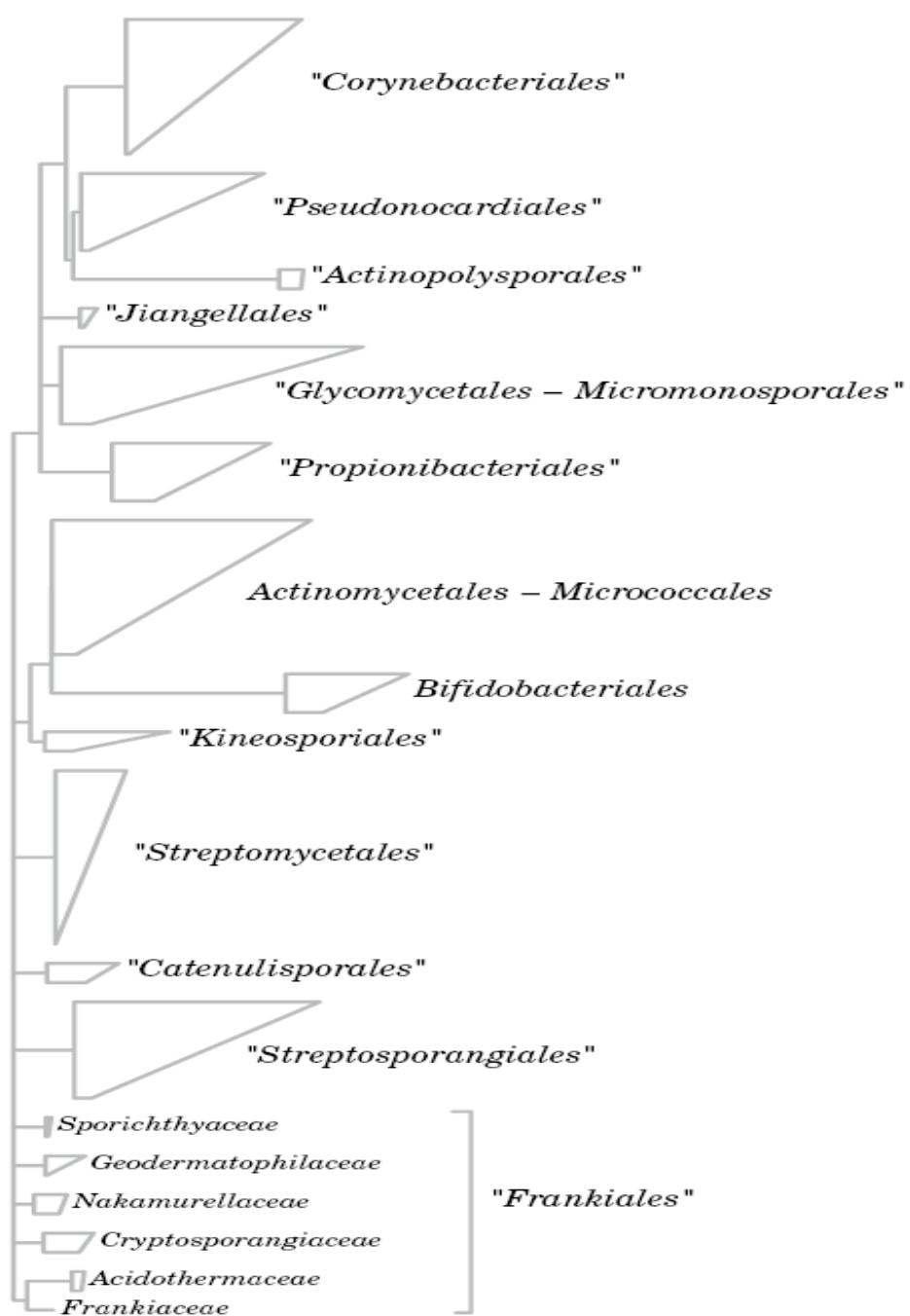
Dans ce contexte, **Meier-Kolthoff et al., 2013** et **Kim et al., 2014**) ont proposé 98,2% et 98,65%, respectivement comme une limite de séparation entre les espèces et ce, sans avoir recours à l'hybridation ADN-ADN.

### **3.4.2. Hybridation ADN-ADN et détermination du pourcentage de guanine-cytosine**

L'hybridation ADN-ADN est indispensable pour l'identification définitive d'une espèce quand les séquences de l'ADNr 16S ont des similarités supérieures au pourcentage du seuil de la détermination de nouvelles espèces. Cette technique consiste à estimer le taux de réassociation (hybridation) de l'ADN génomique d'un taxon avec celui des espèces les plus proches. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance de l'ADN génomique inférieur à 70% (**Wayne et al., 1987**). Chez les bactéries, le pourcentage en guanine et cytosine (G+C) varie entre 25 et 78%. La détermination de ce pourcentage doit être effectuée pour l'espèce-type d'un nouveau genre, mais devient facultative si l'espèce découverte appartient à un genre déjà décrit (**Stackebrandt et al., 1997; Euzéby 2002**).

### **3.4.3. Taux de GC**

Les actinobactéries sont définies par un taux élevé en G+C, supérieur à 55% (**Prescott et al., 2010**). Ce taux a permis de différencier la lignée des actinobactéries de celle des *Bacillaceae*, des *Lactobacillaceae* et d'autres bactéries à Gram positif (G+C inférieur à 55%). Des bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus*, sont considérés comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinobactéries (**Garrity et al. 2004**). Dans le manuel de **Bergey de 2012**, en tenant compte de la phylogénie et des signatures des nucléotides, l'ordre des Actinomycetales a été scindé en plusieurs ordres (**Figure 8**).



**Figure 8.** Ordres de classe d'actinobactéries basée sur l'analyse des séquences ADNr 16S  
(Goodfellow *et al.*, 2012 *in Bergey's Manual*, 2012)

### **3.4.4. Séquençages de nouvelle génération (SNG)**

Un ensemble de nouvelles méthodes de séquençage qui permettent de réaliser du séquençage à très haut débit est apparu à partir de 2005. Les avantages de ces technologies sont nombreux : pas d'étapes de clonage bactérien (et donc pas de biais inhérents à la construction des banques), rapidité (moins d'une semaine) et coûts beaucoup moins élevés (coût par paire de base par Solexa environ 9000 fois moins cher que par le séquençage Sanger). Ces nouveaux séquenceurs sont 454 (Roche), Solexa (Illumina), SOLID (Applied Biosystem), PacBio RS (Pacific Bioscience) et Ion Torrent (Life Technologies).

Nous sommes à l'orée d'une période charnière entre les technologies à haut débit dites de 2<sup>ème</sup> génération qui requièrent une étape d'amplification des molécules d'ADN en amont du décodage, de celles dites de 3<sup>ème</sup> génération permettant le décryptage direct d'une seule molécule matrice d'ADN. L'avancement majeur offert par la SNG est la capacité de produire un énorme volume de données à moindre coût. La capacité de séquencer le génome entier de nombreux organismes a offert la possibilité d'études comparatives et évolutives à grande échelle jusqu'alors inimaginables.

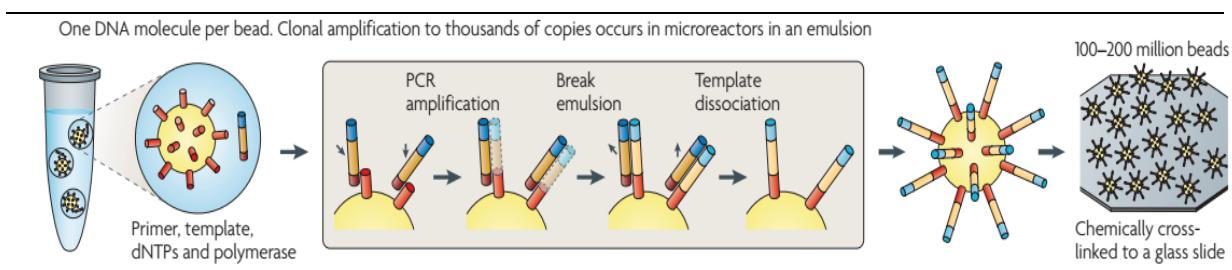
#### **3.4.4.1. Préparation des banques ou librairies**

L'échantillon d'ADN est fragmenté, et la ligation d'adaptateurs aux deux extrémités permet l'utilisation ultérieure d'amorces universelles pour fixer et amplifier chacun de ces fragments d'ADN. Trois types de préparation de librairie sont classiquement décrits : single-end (SE), paired-end (PE), et mate-paired (MP) librairies. Les librairies SE sont créées par la sonication de l'ADN génomique en fragments qui ont moins de 1 kb. Le protocole de la préparation de la librairie paired-end (PE) est proche du protocole utilisé pour la librairie SE, mais les amorces de séquençage différentes sont ligaturées à chaque extrémité. Ainsi les lectures PE sont générées par le séquençage d'un fragment d'ADN à partir des deux extrémités d'une manière séquentielle. Après une analyse de la première lecture avec amorce du séquençage S1, les modèles sont régénérés et la seconde lecture est séquencée par l'utilisation d'amorce du séquençage S2. Cette technologie permet la création de paires de lecture qui se situent entre 200 à 500 pb (paires de bases) (**Metzker, 2010**). Dans des protocoles Mate-pair librairie(MP), l'ADN, fragmenté en fragments de 2 à 5 kb, est ensuite marqué à l'extrémité, circularisé, segmenté et donc à nouveau linéarisé. Les fragments contenant le marqueur et donc les deux extrémités du fragment d'ADN choisis sont séquencés tel que décrit dans le séquençage PE (**Metzker, 2010**).

Après l'étape de la préparation de la librairie initiale, une étape d'amplification d'ADN assure une intensité du signal suffisante pour la détection des nucléotides (PCR en émulsion ou l'amplification par Bridge PCR).

### 3.4.4.2. PCR en émulsion

L'ADN simple brin s'hybride sur les billes qui portent l'oligonucléotide cible. Les billes font partie de l'émulsion (eau et huile) contenant les réactifs nécessaires pour l'amplification par PCR (Réaction en chaîne par polymérisation). Après l'amplification, les billes avec les brins d'ADN amplifiés sont lavées et les billes sont purifiées et immobilisées pour le séquençage (**Figure 9**) (Metzker, 2010 ; Dressman et al., 2003).

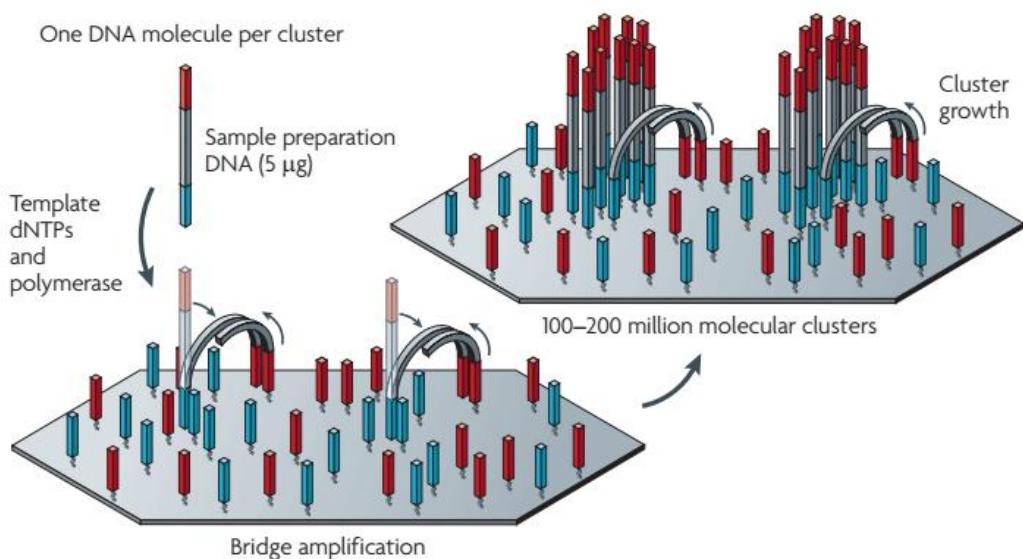


**Figure 9.** Stratégie d'amplification par PCR en émulsion (PCRem) (Dressman et al., 2003)

Un mélange réactionnel constitué d'une émulsion huile-aqueuse est créé pour encapsuler les complexes bille-ADN dans des gouttelettes aqueuses. L'amplification par PCR est réalisée au sein de ces gouttelettes pour créer des billes contenant plusieurs milliers de copies du même fragment. Les billes PCRem sont chimiquement liées à une lame de verre ou déposées dans les puits de la plaque PicoTiter Plate (Metzker, 2010).

### 3.4.4.3. PCR en pont

Dans cette approche, les deux amores de PCR sens et anti-sens sont hybridées sur un substrat ou un support solide par une molécule linker. Après l'amplification tous les amplicons sont immobilisés et regroupés sur un seul emplacement physique (**Figure 10**). Après dénaturation, une étape de lavage élimine tous les fragments d'origine. Les autres liés de manière covalente avec des amores inverses complémentaires de l'extrémité permettent la création des ponts et la synthèse du brin complémentaire. Ensuite l'ADN est dénaturé pour obtenir l'ADN simple brin. De ce fait, des clusters ADN sont produits sur toute la surface solide (Fedurco et al., 2006 ; Mardis, 2008).



**Figure 10 :** Stratégie d'amplification par Bridge PCR (Metzker, 2010).

La PCR en pont ou Bridge PCR est faite en deux étapes : hybridation des amores initiales et élongation simple brin d'un fragment et l'amplification en pont des fragments d'ADN immobilisé avec des amores adjacentes pour former des clusters (Metzker, 2010).

Séquenceurs 2 <sup>ème</sup> génération										
Société	Roche			Illumina			Life Technologies			
Plateforme	GS Junior	454	MiSeq	HiSeq 1000	HiSeq 2000	Genome Analyzer IIx	Ion Torrent PGM	SOLID 4	SOLID 5500	SOLID 5500xl
Technologie	Titanium	FLX Titanium FLX +					Chip 314	Chip 316	Chip 318	
Acides nucléiques (matrice)										
Ligation adaptateurs										
Méthode d'amplification	PCR en émulsion			« Bridge PCR »			PCR en émulsion			
Méthode de séquençage	Synthèse (Pyroséquençage)			Synthèse			Ligation			
Durée de séquençage/run	10h	10h 20h		26h	8jrs	8jrs	14jrs	2h	12jrs	8jrs 8jrs
Capacité (Mb) séquençage/run	50	500 900		1500	100000	200000	95000	>10 >100 >1000	70000	80000 150000
Taille moyenne des reads	400	400 700		150+150	100+100	100+100	150+150	100 >100 >100	50+35	75+35 75+35
Coût (\$)/run	1100	6200		750	10000	20000	11500	500 750 950	8150	6100 10500
Coût machine + annexes ((K\$))	110+25	500+30		125	560	690	250	50+20	480+55	350+55 600+55
Exactitude de séquençage (%)	99	99		99,9	99,9	99,9	99,9	99	99,95	99,95 99,99

**Figure 11 : Les trois plateformes du séquençage haut débit.**

(<http://www.biorigami.com>).

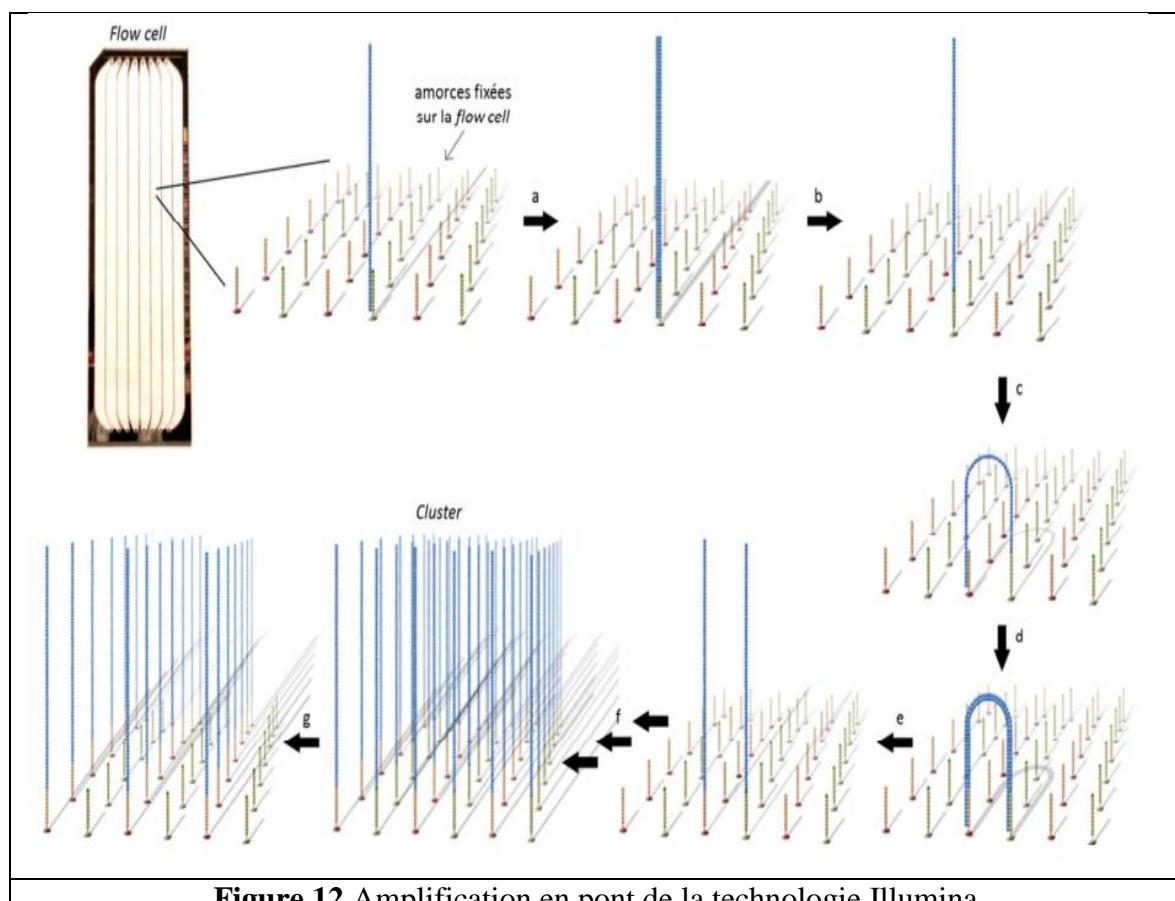
Les trois plateformes de SNG les plus utilisées actuellement sont celles des sociétés commerciales Roche, Illumina, et Life Technologies. Les points positifs sont signalés en couleur verte et les points faibles en rouge (**Figure 11**).

#### 3.4.4.4. Séquençage Illumina

La spécificité de cette technologie repose sur une amplification en pont (bridge PCR) des fragments à séquencer. Elle a lieu sur une surface de verre appelée *FlowCell* (FC),

similaire à une lame de microscopie, divisée en huit lignes (à l'origine, une ligne par échantillon).

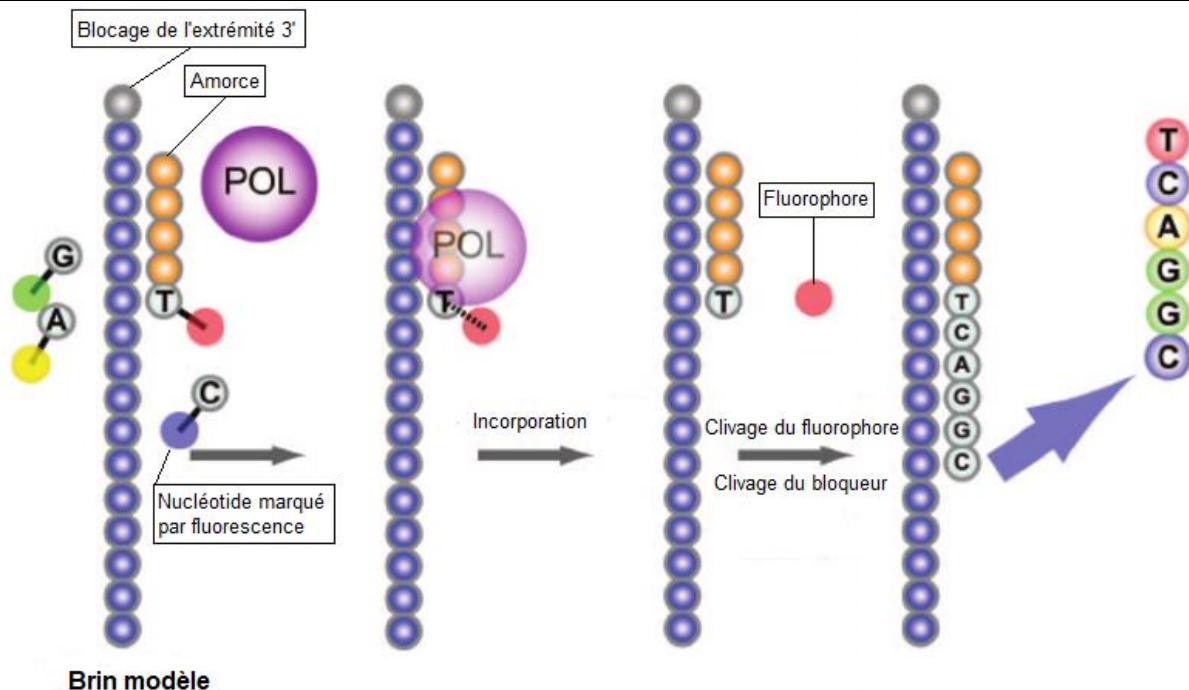
Les fragments de la librairie à séquencer possèdent des adaptateurs à leurs extrémités. Ceux-ci vont leur permettre de se fixer de façon aléatoire sur la FC, par hybridation sur les amores qui en couvrent la surface (**Figure 12**). Un nouveau brin est alors synthétisé par une polymérase : il est fixé de façon covalente à la FC. Le brin d'origine est alors éliminé par dénaturation (b) et l'extrémité libre du brin restant s'hybride à une amorce adjacente pour former un pont (c). La polymérase synthétise à nouveau le brin complémentaire pour former un pont d'ADN double brin (d) puis les deux copies sont libérées par dénaturation (e). Le cycle d'amplification en pont (étapes c à e) recommence pour former à terme un regroupement d'ADN clonal en une zone appelée *cluster* (f). Les brins anti-sens (correspondant aux amores vertes) sont ensuite clivés (g) : c'est la linéarisation.



**Figure 12.**Amplification en pont de la technologie Illumina

L'extrémité 3' libre des fragments d'ADN est bloquée et l'amorce de séquençage s'y hybride (**Figure 13**). Le séquençage s'effectue sur des centaines de millions de *clusters* simultanément, grâce à une chimie de terminateurs réversibles : des nucléotides bloqués marqués par fluorescence sont ajoutés, l'un d'entre eux est incorporé, la fluorescence émise

est relevée puis le fluorophore et le bloqueur sont clivés permettant l'ajout d'un nouveau nucléotide. À chaque cycle d'incorporation, une base peut être déterminée.



**Figure 13 :** Aperçu de la technologie de séquençage Illumina

#### 3.4.4.5. Annotation des génomes

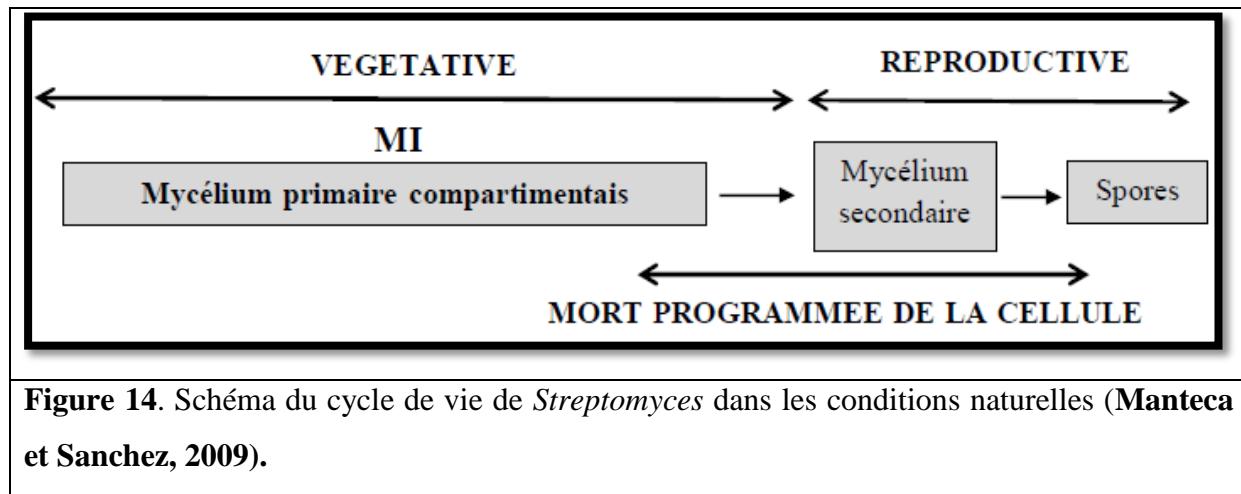
Différents outils informatiques sont largement utilisés pour l'annotation des génomes bactériens, Rapid Annotation using Subsystem Technology (**RAST**, Aziz *et al.*, 2008), Prokka (Seeman, 2014) est un package utilisé aussi pour une annotation rapide des génomes de petite taille, l'annotation des phages réalisé par PHAge Search Tool (PHAST, (Zhou *et al.*, 2011). En utilisant ces logicielles d'informatique fonctionnelle le génome peut être rapidement annoté. L'Analyse comparative est basée sur BLAST (Altschul *et al.*, 1990) pour pouvoir comparer le génome de souches étudiés avec ceux d'autres souches de références complètement séquencées. Les séquences génomiques des souches utilisées pour l'étude comparative sont extraites du GenBank (National Center for Biotechnology information (**NCBI**. <http://ncbi.nlm.nih.gov>) Sous des numéros d'accessions.

### III. Cycle de développement d'actinobactéries

Tout comme les autres eucaryotes, les actinobactéries possèdent un cycle de vie complexe, qui est le résultat de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort (Danilenko *et al.*, 2005).

Il débute par la germination d'une spore, processus qui nécessite la présence des ions de calcium.

Cette germination donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifient et non fragmenté et se développent par croissance apicale (**O'Gara et al., 2008**), (**Figure 14**).



**Figure 14.** Schéma du cycle de vie de *Streptomyces* dans les conditions naturelles (**Manteca et Sanchez, 2009**).

Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le 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 (**Kim et al., 2004 ; Smaoui, 2010**). Ces spores naissent par séptation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement. La différenciation morphologique s'accompagne d'une différentiation 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, 2006**). Le mycélium du substrat s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment-là que les composés médicalement utiles sont synthétisés, et on les appelle métabolites secondaires (**Smaoui, 2010**). Le mycélium aérien émerge par la réutilisation de composés assimilés par le mycélium végétatif tels que l'ADN, les protéines ainsi que des composés stockés résultants de la lyse du mycélium de Substrat (**Ou et al., 2008**). Lorsque la croissance du mycélium aérien s'arrête, contrairement au mycélium végétatif, des septas sont formés à des intervalles réguliers le long de l'hyphe formant des compartiments uni-génomiques. Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporongiospores. 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., 2010**).

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

Il a été estimé qu'environ 60 % des *Streptomyces* produisent pendant la phase de limitation nutritionnelle, une famille de protéines du type  $\gamma$ -butyrolactone (**Saffroy, 2006**). Ces protéines constituent des intermédiaires entre les modifications du milieu de culture et la synthèse des antibiotiques (**Demain et Dykhuizen, 2006**).

## **1. Formation des spores par les actinobactéries**

Les divers types de spores des actinobactéries peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exo-spores et endospores (**Theilleux, 1993**). Ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (**Saffroy, 2006**). Les exo-spores sont le type le plus fréquent et les moins résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, alors que les endospores sont hautement résistantes à la chaleur et autres adversités (**Kitouni, 2007**).

### **1.1. Les Exo-spores**

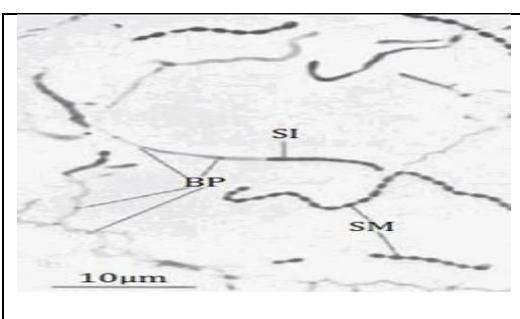
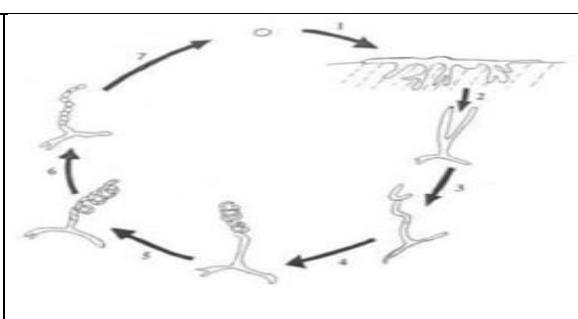
Les actinobactéries forment généralement des exo-spores qui peuvent avoir des formes très variables. Elles naissent de la formation de parois transversales à partir des hyphes existantes. Une subdivision supplémentaire est également réalisée selon la présence ou l'absence d'une enveloppe qui recouvre la paroi de l'hyphe sporogène (**Kitouni, 2007**). Ainsi, la formation d'exo-spores par fragmentation d'hyphes avec enveloppe est la plus fréquente et se retrouve notamment chez *Actinoplanes* et *Streptomyces*. La formation d'exo-spores par fragmentation d'hyphes du substrat sans enveloppe se rencontre chez *Micromonospora*. Ces spores sont dépourvues de structures spécialisées. Ces exo-spores contiennent la plupart des éléments du mycélium primaire (**Figure 15**) :

- Un seul nucléotide correspondant à un seul génome haploïde pour les spores de *Streptomyces*. Le contenu du génome des exo-spores est plus riche en ADN mais moins en ARN que celui du mycélium du substrat.

- Des ribosomes dissociables en sous-unités 30 S et 50 S.
- Un système membranaire intracytoplasmique.
- Des vacuoles.
- Une membrane cytoplasmique.

## 1.2. Endospores

Les endospores naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*. Dans ce groupe, une subdivision supplémentaire est réalisée en fonction du mode de formation de la nouvelle paroi (**Locci et Sharples, 1984**). On parle ainsi de « sporulation hétérothallique », caractéristique des genres *Planomonospora* et *Dactylosporangium*, lorsque la nouvelle paroi se forme entre la membrane cytoplasmique et la paroi de l'hyphe parentérale et de « sporulation homothallique », caractéristique du genre *Thermoactinomyces*, lorsque la nouvelle paroi qui délimite la spore provient, au moins en partie, de toutes les couches pariétales de l'hyphe parentérale, recouverte ou non d'une enveloppe (**Kitouni, 2007**). Les endospores sont produites par des actinobactéries thermophiles et sont semblables, morphologiquement et chimiquement, à celles des *Bacillaceae*. Elles contiennent une paroi externe épaisse, multicouche et résistante, qui enveloppe le cortex, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes et le nucléoïde. Elles contiennent aussi de l'acide dipicolinique. Cet acide, probablement situé dans la partie centrale de la spore, est un composé unique qui est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur. De grandes quantités d'ions calcium et magnésium sont également associées à la présence de cet acide dans la spore. Les endospores des thermoactinobactéries peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies (**Sykes et Skinner, 1973**) (**Figure 16**) :

	
<b>Figure 15.</b> hyphe végétative et conidiospores de <i>S. coelicolor</i> , SI : spores immatures, BP : Bordure de la paroi, SM : spore matures ( <b>Chater et Hopwood, 1973</b> ).	<b>Figure 16.</b> Développement du mycélium secondaire en spores ( <b>Saffroy, 2006</b> ) (1) : germination de la spore et développement du mycélium primaire (2) : développement du mycélium secondaire (3-4) : enroulement du mycélium aérien (5-6) : cloisonnement et formation des spores (7) : Libération des spores

#### **IV. Habitat d'Actinobactéries**

##### **1. Environnement terrestres**

Le sol demeure l'habitat le plus important pour les actinobactéries dont les streptomycètes existant en tant que composante majeure de leur population. Selon de nombreux rapports, les espèces du genre *Streptomyces* ont été signalées pour être les plus abondants et les plus isolées dans chaque étude. Les actinobactéries terrestres présentent divers potentiels antimicrobiens intéressants (**Oskay AM, et al., 2005**). Ces actinobactéries isolées avaient la capacité de produire de nouveaux antibiotiques à forte activité antibactérienne. Dans la rhizosphère de mangrove anoxique, les espèces d'actinobactéries telles que *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Nocardioform* ont été les plus abondantes (**Tan, et al., 2009**). De même, *Nocardia* isolée du sol de mangrove a produit de nouveaux métabolites cytotoxiques qui inhibaient fortement les lignées cellulaires humaines, telles que l'adénocarcinome gastrique (**Schneider et al., 2006**). Le sol de désert est également considéré comme un environnement terrestre extrême où seules certaines espèces, en particulier les actinobactéries, utilisent souvent une espèce de cyanobactéries, le *Microcoleus chthonopastes* comme source de nutriment. D'ailleurs il existe plusieurs rapports montrant la distribution des actinobactéries dans divers endroits, tels que le sol sablonneux, le sol alcalin noir, le sol limoneux sablonneux, le sol de désert alcalin et le sol de désert subtropical. Dans ces différents sols, *Streptomyces sp.* était dominant suivis par d'autres genres, tels que *Nocardia*, *Nocardiopsis* et *Actinomycetes* (**Cundell et Piechoski, 2016**). Dans une étude réalisée par (**Nithya et al., 2015**), 134 actinobactéries cultivables morphologiquement distinctes, provenant de 10 échantillons de sol de désert différent, ces isolats avaient un degré variable d'activité antibactérienne vis-à-vis des agents bactériens pathogènes.

Les actinobactéries jouent également un rôle majeur au sein de la communauté microbienne de la rhizosphère, dans le renouvellement de la matière organique végétale et par conséquent, la zone rhizosphérique est considérée comme l'une des meilleurs habitats pour l'isolement de ces microorganismes.

Dans une autre étude effectuée par **Priyadharsini et Dhanasekaran, 2015**, 45 colonies bactériennes isolées de sols de rizières et morphologiquement différentes ont montré une importante capacité d'inhibition de la croissance de *Cyperus rotundus*. Parmi ces isolats figurent *Streptomyce sp.*, *Streptoverticillium sp.*.

## **2. Eaux douces et marines**

Les Actinobactéries sont bien représentés dans ces milieux d'où l'on peut facilement isoler des souches de *Microspora*, d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangium*.

C'est essentiellement dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa saveur. Alors qu'ils sont absents dans les eaux minières très acides ( $\text{pH} < 1$ ) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (**Xu et al., 1996 ; Hwang et al., 2001**).

## **3. l'Air**

L'air ne constitue pas un habitat pour les actinobactéries, mais un moyen de transport. Les spores des actinobactéries sont des contaminants importants de notre environnement. Les spores de certains actinobactéries se développent dans des matériaux détériorés et lorsqu'elles sont inhalées provoquant des maladies respiratoires (Nocardiose pulmonaire). Les spores d'actinobactéries thermophiles sont produites en une grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air (**Mazodier, 1974**).

**Rapport-gratuit.com**   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

## **4. Les Composts**

Des actinobactéries sont isolés des composts, il s'agit de genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autres thermotolérants tels que *Microbisporea*, *Micropolyspora*, *Pseudonocadia* (**Ensign et al., 1993 ; Lacey, 1997 ; Song et al., 2001**). Les actinobactéries sont actives dans les derniers stades du compostage. Ils se sont spécialisés dans l'attaque des structures plus résistantes comme la cellulose, la Kératine, l'hémicellulose et la lignine (**Zermane, 2007**).

## **5. Les végétaux, les animaux et l'homme**

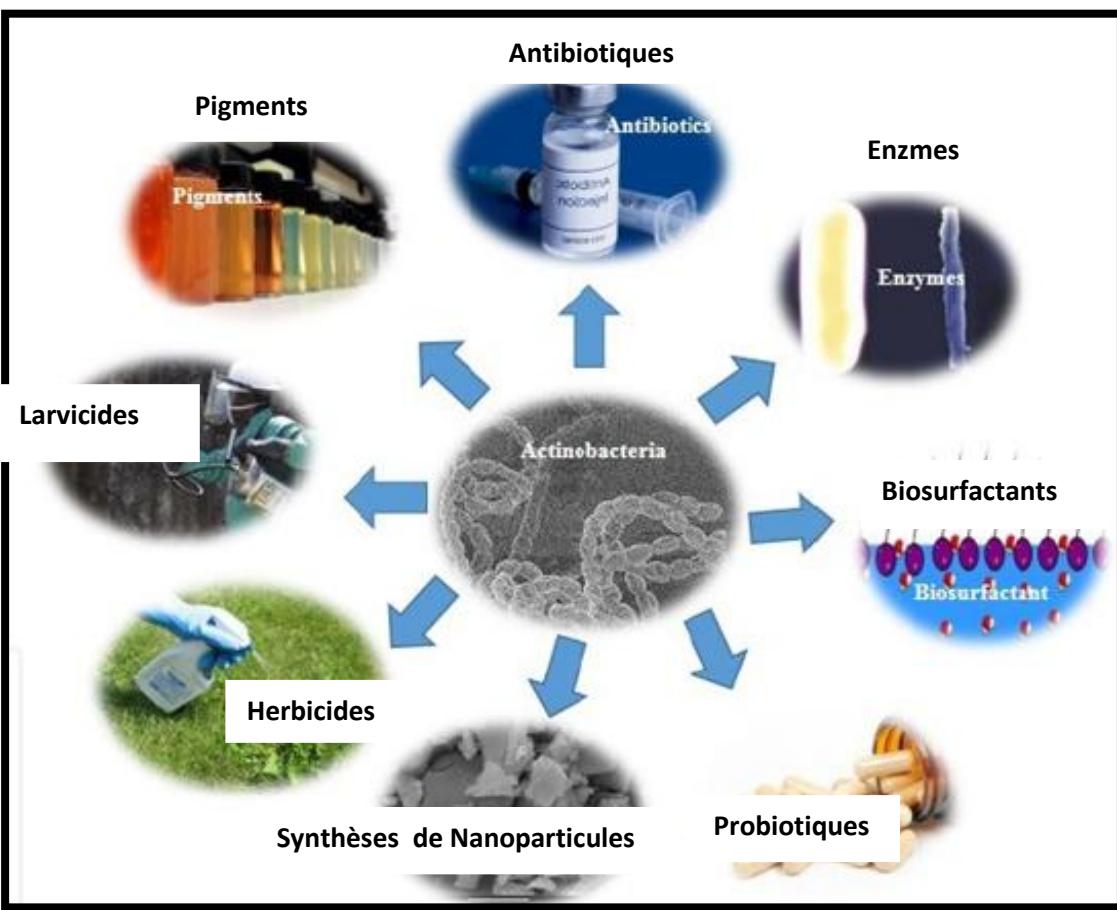
Dans la distribution naturelle des actinobactéries, il faut ajouter les végétaux, les animaux et l'homme. Parmi les exemples les mieux connus, il faut citer : *Streptomyces scabies*, *Actinomyces bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Nocardia asteroides* et *Micropolyspora faeni* (**Zermane, 2007**). *Actinomyces massiliensi* sp.nov isolée du sang d'un patient (**Renvoise et al, 2009**), *Actinomyces timonensis* sp. nov. isolée d'un patient qui atteint un ostéo-articulation (**Renvoise et al, 2010**). Le **Tabeau 05** présente quelques habitats de certains actinobactéries.

**Tableau 5.** Habitats de certains actinobactéries (**Grigorova et Norris, 1990**).

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

## V. Applications des actinobactéries

Les actinobactéries sont bien reconnues pour leur production de métabolites primaires et secondaires qui ont des applications importantes dans divers domaines. Ils sont également une source prometteuse de large gamme d'enzymes importantes, qui sont produites à l'échelle industrielle (Laccaze, tyrosinase et cellulase ..ect) . Une grande fraction d'antibiotiques sur le marché provient d'actinobacteries. Ils produisent des inhibiteurs enzymatiques utiles pour le traitement du cancer et les immunomodifiants qui améliorent la réponse immunitaire. Ils ont la capacité de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aromatiques et aliphatiques (**Skplovska et al., 2003**). Ils effectuent des transformations de composés organiques. De nombreux genres d'actinobacteries peuvent être potentiellement utilisés dans la bioconversion des déchets agricoles et urbains sous-utilisés en produits chimiques de haute valeur. Les actinobactéries sont également importantes dans le domaine de la biotechnologie végétale (PGPR), en effet, certaines sont utiles dans la lutte biologique. Leur potentiel métabolique offre un domaine de recherche important, la **Figure 17** ci-dessous présente une brève description des applications importantes des actinobactéries.

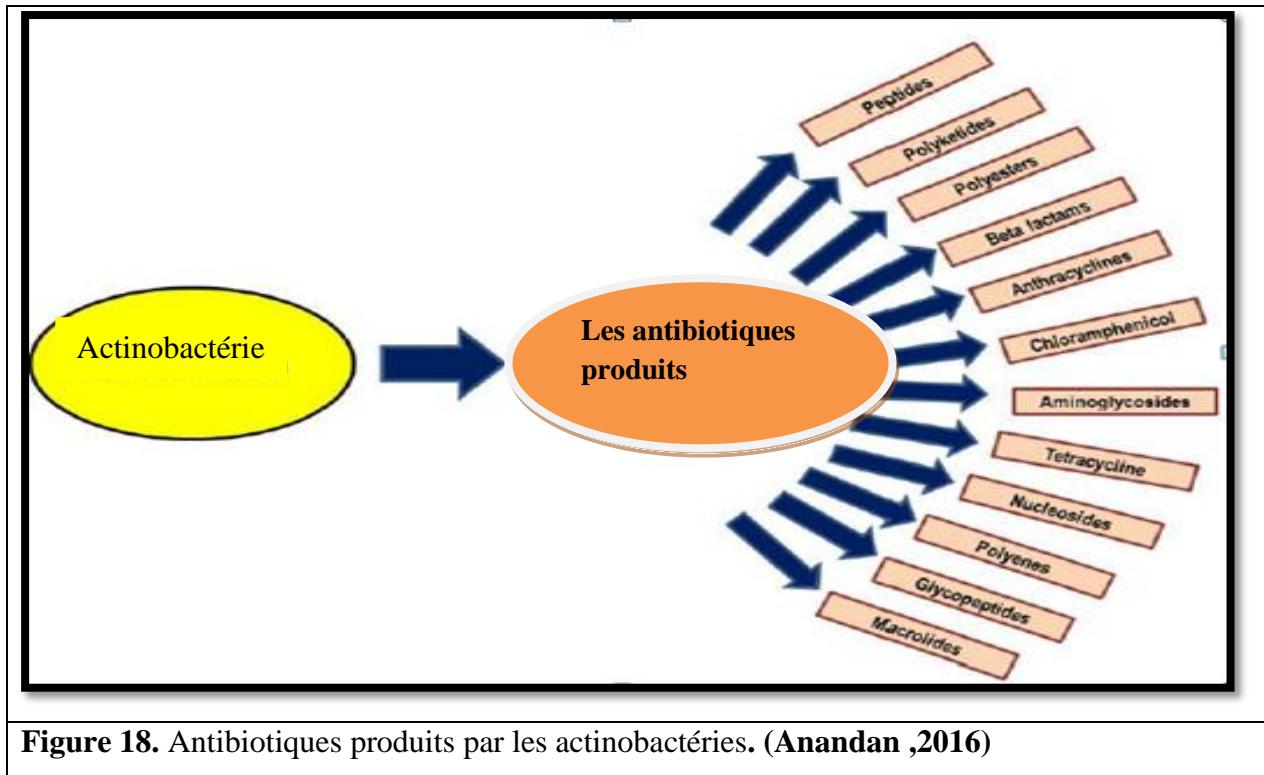


**Figure 17.** Applications biotechnologiques des actinobactéries. (Anandan, 2016)

### 1. Production des métabolites antimicrobiens (Les Antibiotiques)

Les actinobactéries jouent un rôle important dans la production des antibiotiques. Ces médicaments sont variés et extrêmement importants pour notre santé. Ils sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelles et leurs dérivés. Or, les maladies dues à des bactéries pathogènes multirésistantes augmentent vigoureusement. Ces résistances d'étendent quantitativement mais aussi qualitativement depuis plus de 20 ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrit avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes (Alekshun et levy, 2007). Face à la perte d'efficacité de certains antibiotiques, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les efforts se concentrent sur la recherche de nouveaux antibiotiques avec des nouveaux mécanismes d'action et qui ne comportent aucun effet toxique. La Figure 18 ci-dessous montre que la majorité d'antibiotiques proviennent de micro-organismes, en particulier des espèces d'actinobactéries. D'ailleurs près de 80% des antibiotiques commercialisés sont dérivés d'actinobactéries,

principalement des genres *Streptomyces* et *Micromonospora* (Jensen *et al.*, 1991; Hassan *et al.*, 2011).

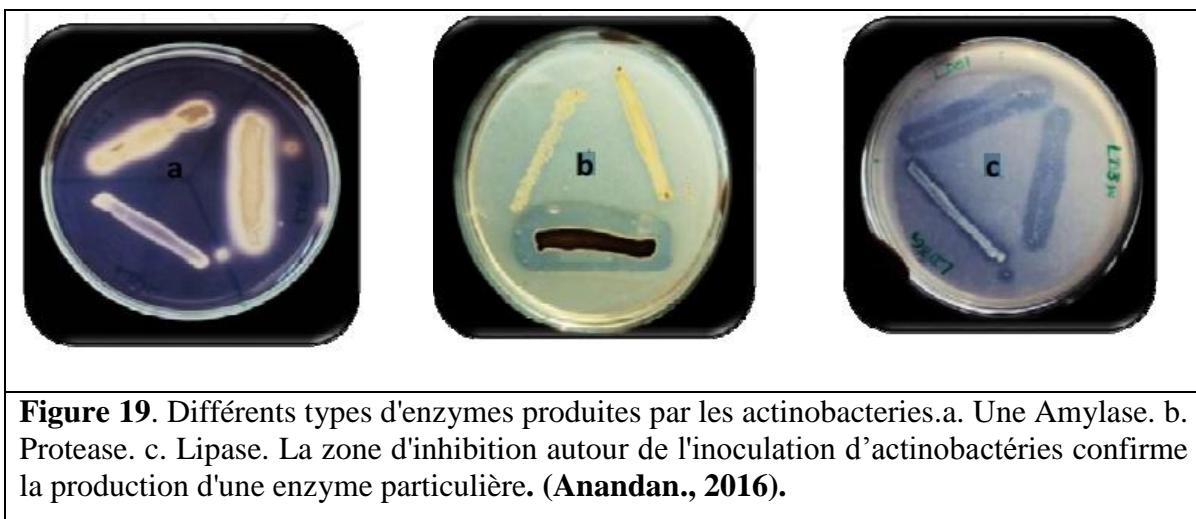


**Figure 18.** Antibiotiques produits par les actinobactéries. (Anandan ,2016)

## 2. Production d'enzymes

Une grande variété d'enzymes biologiquement actives sont produites à la fois par des actinobactéries marines et terrestres qui sécrètent des amylases à l'extérieur des cellules, ce qui les aide à effectuer une digestion extracellulaire. Cette enzyme est très importante dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et les industries du textile et du papier en raison de leur capacité à dégrader l'amidon (Pandey *et al.*, 2000). Un autre aspect important des actinobactéries est la production de cellulases, qui constituent une collection d'enzymes hydrolytiques qui hydrolysent les liaisons glucosidiques de la cellulose et des dérivés apparentés de cello-digosaccharide. La lipase est produite à partir de divers actinobactéries, bactéries et champignons et est utilisée dans les industries des détergents, des denrées alimentaires, des oléochimiques, des paramètres de diagnostiques, mais aussi dans les industries de domaine pharmaceutiques (Schmid et Verger, 1998). Les fonctions biologiques des actinobactéries dépendent principalement de sources à partir desquelles les bactéries sont isolées. Les actinobactéries, en particulier les Streptomycètes, sont connues pour sécréter des protéases multiples dans le milieu de culture (Sharmin *et al.*, 2005).

De même, les actinobactéries ont été révélées être une excellente source pour la L-asparaginase, qui est produite par une gamme d'actinobactéries, principalement celles isolées des sols, telles que *Streptomyces griseus*, *Streptomyces karnatakensis*, *Streptomyces albidoflavus* et *Nocardia sp* (**Dejong, 1972; Narayana et al., 2008**). Des enzymes telles que la catalase, la chitinase et l'uréase sont également produites à partir d'actinoabactéries. La kératinase, une enzyme qui dégrade la plume de poulet de volaille a été produite avec succès à partir de *Nocradiopsis sp.* SD5, isolé des déchets de plumes dans Tamil Nadu, Inde (**Saha et al., 2013**). De même, les actinobactéries isolées à partir d'intestins de poulet et de chèvre ont montré la présence de diverses enzymes telles que l'amylase, la protéase, la phytase et la lipase, **Figure 19**, (**Latha et Dhanasekaran, 2013**).



**Figure 19.** Différents types d'enzymes produites par les actinobacteries.a. Une Amylase. b. Protease. c. Lipase. La zone d'inhibition autour de l'inoculation d'actinobactéries confirme la production d'une enzyme particulière. (**Anandan., 2016**).

### 3. Production des Bioherbicides

Une autre application intéressante de l'actinobactérie est l'utilisation de leurs métabolites secondaires comme herbicides contre les mauvaises herbes. *Streptomyces saganonensis* produit des herbicides (herbimycines) qui contrôlent les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones. L'anisomycine, produite par *Streptomyces sp.*, est un type d'inhibiteur de croissance pour les mauvaises herbes herbacées annuelles telles que le gazon de crabe et les mauvaises herbes à feuilles larges; L'anisomycine peut inhiber la capacité des plantes à synthétiser la chlorophylle de même, le bialaphos, un métabolite de *Streptomyces viridochromogenes*, est largement utilisé pour contrôler les mauvaises herbes herbacées annuelles et pérennes et les mauvaises herbes à feuilles larges en inhibant la synthèse de la glutamine. L'espèce de *S. hygroscopicus* produit de la coformycine carbocyclique et de l'hydantocidine, ce qui peut réduire la synthèse de l'aclenylosuccinate en augmentant le contenu de l'ATP et en retenant la synthèse (**Pillmoor, 1998**).

De plus, la phthoxazoline, l'hydantocidine et l'homoalanosine de *Streptomyces sp.* peuvent contrôler plusieurs mauvaises herbes (**Yan Chu, 1993.**., **(Dhanasekaran et al., 2010)** ont signalé que *Streptomyces sp.* avait la capacité d'inhiber la croissance *d'Echinochilora crusgalli*. De même, l'efficacité des souches de *Streptomyces sp.* KA1-3, KA1-4, KA1-7 et KA23A (**Dhanasekaran et al., 2012**).

En **2013** les travaux de **Priyadharsini** et ses collaborateurs ont prouvé une activité herbicide des composés bioactifs tel que N-phénylpropanamide et N-naphtalène-1-yl propanamide de *Streptomyces sp.*KA1-3.

#### **4. Production de Vitamines**

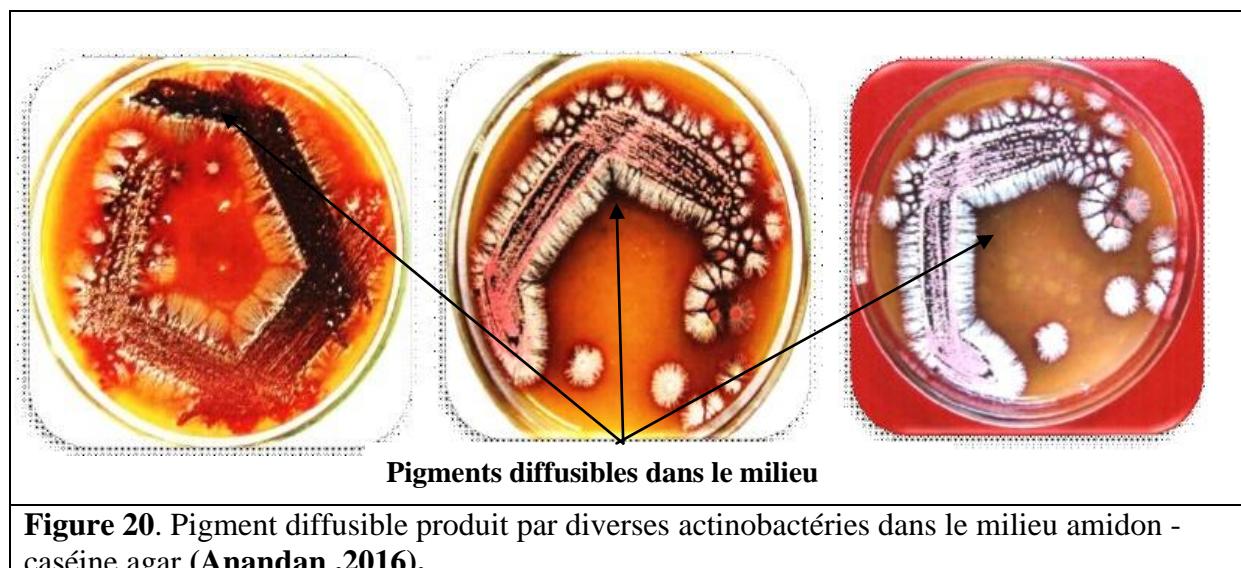
La vitamine B12 telle qu'elle existe dans la nature peut être produite par des bactéries ou des actinobactéries. L'isolement de la vitamine B12 à partir des fermentations d'actinobacteries a suscité un intérêt considérable pour la production possible de vitamines par des fermentations microbiennes (**Rickes et al., 1948** ; **Lichtman et al., 1949**). L'addition de sels de cobalt aux milieux semble être un précurseur pour toutes les actinobactéries pour produire de la vitamine. Comme le cobalt est un agent bactéricide assez efficace, ce précurseur doit être ajouté avec précaution. Les fermentations produisant l'antibiotique streptomycine, auréomycine, griseine et néomycine produiront aussi de la vitamine B12 si le milieu est complété par du cobalt sans affecter les rendements des substances antibiotiques. Plusieurs études ont suggéré que certaines actinobactéries qui ne produisent pas d'antibiotiques, synthétisent plus de vitamine. Il a également été démontré que les actinobactéries produisaient d'autres vitamines hydrosolubles, telles que, la thiamine et le dérivé d'acide pteroylglutamique qui favorise la croissance de certaines souches de *Leuconostoc citrovorum* et de la coenzyme A (**Anandan., 2016**).

#### **5. Production de Pigments**

Les actinobactéries sont caractérisées par la production de divers pigments sur des milieux naturels ou synthétiques, ces pigments sont considérés comme une des caractéristiques culturales importantes dans la description des organismes. Tous les changements phénotypiques induits par des influences environnementales aideront les actinobactéries car, ils montrent des colonies morphologiquement distinctives et produisent une variété de pigments et de filaments appelés hyphes aériens (**Goodfellow et al., 2012**).

Ces pigments apparaissent habituellement dans différentes nuances de bleu, violet, rouge, rose, jaune, vert, brun et noir (**Figure 20**). Les pigments produits par *Streptomyces* peuvent être soit des endopigments (liés à certaines structures cellulaires), soit des exopigments (excrétés dans le milieu environnant). Etant donné, que la production du pigment est influencée par le pH du milieu, l'aération, la température de la croissance et les sources de carbone et d'azote, donc peu d'informations sont disponibles sur la nature chimique des pigments. La production des pigments est également liée aux mécanismes respiratoires, aux mécanismes de défense et à la protection aux rayons ultraviolette.

Ces actinobactéries ont également la capacité à synthétiser et à excréter des pigments noirs, appelés la mélanine ou le mélanoïde, qui sont considérés comme un critère utile pour les études taxonomiques. D'ailleurs, l'industrie textile produit et utilise environ 1,3 million de tonnes de colorants, de pigments et de précurseurs de colorants.



## 6. Bioremédiation

Les actinobactéries possèdent de nombreuses propriétés industrielles, ce sont des bons candidats pour une application dans la bioremédiation des sols contaminés par des polluants organiques. Dans certains sites contaminés, les actinobactéries représentent le groupe dominant parmi les agents dégradants (**Johnsen et al., 2002**). Certains travaux suggèrent que la flore de *Streptomyces* pourrait intervenir dans le recyclage du carbone organique et peuvent dégrader les polymères complexes (**Sanscartier et al., 2009**). Ce groupe de composés est devenue l'un des contaminants les plus courants des grandes surfaces du sol et par conséquent considéré comme un problème environnemental majeur.

Certains travaux suggèrent que la flore de *Streptomyces* pourrait jouer un rôle très important dans la dégradation des hydrocarbures. De nombreuses souches d'actinobactéries ont la capacité de solubiliser la lignine et de dégrader les composés liés à la lignine en produisant des enzymes dégradant la cellulose et l'hémicellulose (**Adandan., 2016**). Dans une même optique, des espèces d'actinobactéries avaient la capacité de vivre dans un environnement huileux et peuvent donc être utilisées dans la bioremédiation pour réduire les polluants pétrolifères. *Nocradiopsis sp.* SD5 a dégradé les déchets de plumes en produisant de l'enzyme kératinase (**Saha et al., 2013**).

## **7. Utilisation des actinobactéries en lutte biologique**

Dans le domaine de la pathologie végétale, la lutte biologique est la lutte menée contre les agents responsables des maladies des plantes au moyen de micro-organismes antagonistes. Les actinobactéries possèdent les principales propriétés de l'antagoniste idéal (**Sabaou et al., 1990**) défini par plusieurs auteurs. Ces critères laissent supposer que ce groupe de micro-organismes peut jouer un rôle primordial dans le domaine de la protection des plantes contre leurs bio-agresseurs. D'une manière générale, ces micro-organismes se caractérisent par :

- ❖ un taux de multiplication très élevé. La forte sporulation permet une importante dissémination.
- ❖ un taux élevé de colonisation de la rhizosphère et leur maintien en conditions défavorables.
- ❖ Une adaptation à la vie aérienne et souterraine le met en contact direct avec de nombreux pathogènes.
- ❖ Les facultés antagonistes des actinobactéries s'expliquent de façon diverses (compétition spatiale et nutritionnelle, hyper parasitisme et antibiose).
- ❖ La phytopathogénicité chez les actinobactériennes est inconnue.
- ❖ Enfin, la grande variabilité des souches en ce qui concerne les propriétés physiologiques et antagonistes et leur expression peut rendre la sélection difficile (**Omrane, 2014**).

### **Actinobactéries –Famille- *Streptomycétacées***

#### **VI. Famille des Streptomycétacées**

Il existe deux genres dans cette famille : *Streptomyces* et *Micromonospora*. Depuis quelques années (**Zhang et al., 1997**) ont introduit le genre *Kitasatospora* et le genre *Streptacidiphilus* ayant un phénotype différent que celle de *Streptomyces*, ainsi que le genre

*Streptomyces* qui renferme plusieurs espèces très répandues dans le sol. Il se reproduit par des conidies en chaîne. L'examen des colonies de *Streptomyces* permet de discerner :

- ❖ Le mycélium végétatif très serré, implanté dans le milieu auquel il adhère (leurs colonies sont difficiles à prélever au fil de platine).
- ❖ Le mycélium aérien, lâche, d'aspect poudreux, formé d'hyphe portant à leurs extrémités des conidies (**Williams, 1978**).

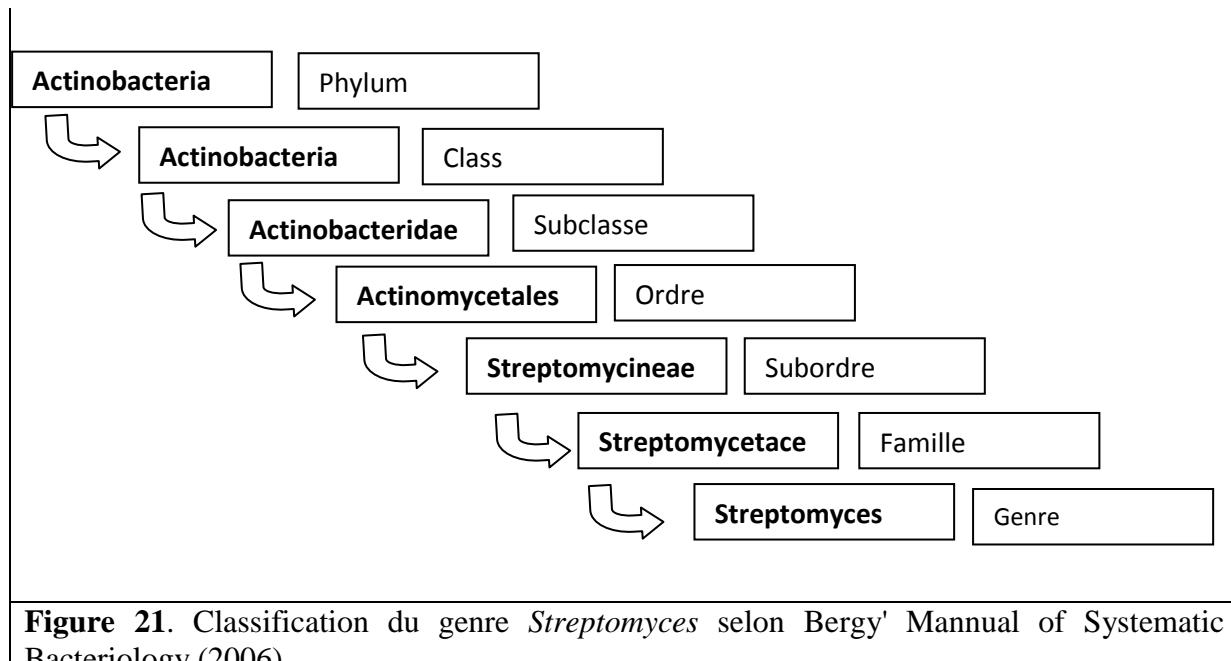
## **1. Le genre *Streptomyces***

*Streptomyces* est un actinobactérie commun du sol connu pour sa production d'antibiotiques comme les tétracyclines, le chloramphénicol, la streptomycine et l'érythromycine. *Streptomyces* est responsable de l'odeur « de terre » du sol, due à la production de géosmines (*ge*, terre ; *osme*, odeur) (**Madigan et Martinko., 2007**). Il s'agit d'un mélange de composés tel l'acide acétique, l'acétaldéhyde, l'alcool éthylique, l'alcool isobutylique et l'ammoniaque (**Lacey, 1961** ; **Gerber, Lechevalier, 1965**). Ce genre compte un très grand nombre d'espèces. En effet, plus de 500 espèces sont actuellement associées à ce genre, bien que le pourcentage guanine et cytosine se situe entre 69 et 73%. Les filaments mycéliens ont un diamètre compris entre 0,5 et 1µm et une longueur variable (**Madigan et Martinko, 2007**).

Plusieurs travaux ont montré que les *Streptomyces* sont des antagonistes des champignons telluriques et ont la capacité de coloniser les racines de plantes hôtes (**El-Tarably et Sivasithamparam, 2006** ; **Cao et al., 2005**; **Xiao et al., 2002**), Ces propriétés favorisent leur utilisation en agriculture, étant donné que, 60% des composés antimicrobiens utilisés dans ce domaine sont isolés à partir de *Streptomyces sp.* (**Ilic et al., 2007**). La plupart des composés issus des *Streptomyces sp* utilisés en agriculture, dont certains composés appartenant à la famille des polyketides (**Savic et Vasiljevic, 2006**).

### **1.1. Classification du genre *Streptomyces* (Bergey's manual of systematic bacteriology, 2006).**

Selon le manuel de Bergey's de systématique bactériennes, 2006, la taxonomie de ce genre est la suivante :

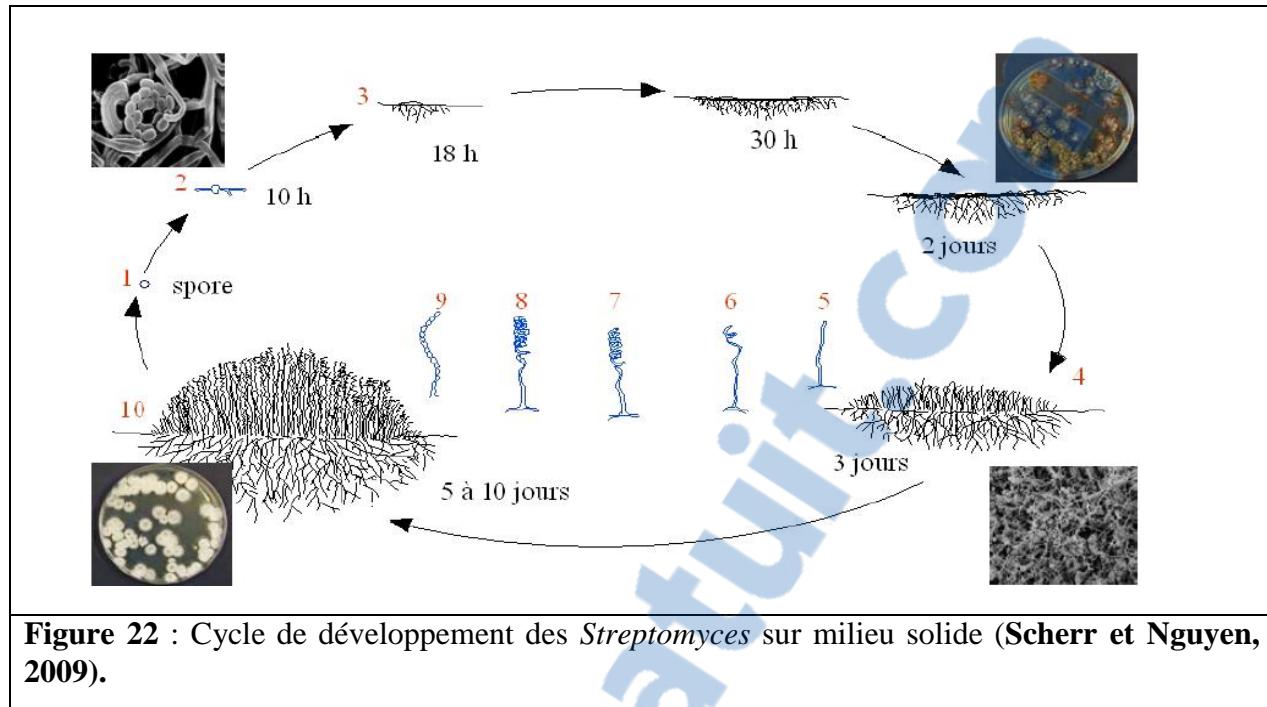


**Figure 21.** Classification du genre *Streptomyces* selon Bergy' Manual of Systematic Bacteriology (2006).

## 1.2. Cycle de développement

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

Le genre *Streptomyces* possède un cycle de développement complexe sur milieu solide. Il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hypes non septés, polynucléés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. La germination de spores comprend quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance (**Manteca et Sanchez, 2010**) (**Figure 22**).



**Figure 22 :** Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Scherr et Nguyen, 2009).

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si de très rares *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement. En milieu solide, une différentiation morphologique est donc observée (formation du mycélium aérien) tandis qu'en milieu liquide, la différentiation est généralement physiologique (Olmos et al., 2013).

### 1.3. Caractéristiques du genre *Streptomyces*

Les *Streptomyces* ont pour niche écologique le sol (Pandey et al., 2003). La majorité des *Streptomyces* jouent un rôle important dans la décomposition de différents biopolymères et dans la minéralisation de la matière organique. Ces bactéries saprophytes produisent diverses enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de nombreuses macromolécules issues des plantes et des animaux (chitine, pectine, amidon, kératine, élastine, etc.) (Hirsh et Christensen, 1983 ; Aghighi et al., 2004). Ce sont des eubactéries de l'ordre des *Actinomycetales*. Cette sous division des bactéries à Gram+ (Lo et al., 2002) . 70% de ces micro-organismes sont producteurs de métabolites secondaires, parmi eux 95% appartiennent au genre *Streptomyces* sp. (Bastide et al., 1986).

#### 1.3.1. Génétique des *Streptomyces*

L'ADN chromosomal des *Streptomyces* a une taille moyenne estimée par des expériences d'électrophorèse en champs pulsé, d'environ 8000 kilobases ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens, en effet la taille des chromosomes bactériens varie de 580 kb

pour *Mycoplasma genitalium*, bactérie parasitaire à Gram+, à 9450 kb pour *Myxococcus xanthus* (**Goldman et al., 2006**). Le chromosome de grande taille présente une organisation génétique unique, en effet la région centrale, conservée à travers des espèces, contient les gènes «essentiels», les régions terminales sont spécifiques de souches et d'espèces et regroupent les gènes «accessoires». Ces gènes représentent jusqu'à 20% du génome total. Les Streptomycètes sont connus pour la richesse de leur métabolisme secondaire et ont été largement étudiés du fait de l'importance évidente des métabolites secondaires en biotechnologie (**Hodgson, 2000**).

#### **1.4. Identification moléculaire (ARN ribosomique 16S des Streptomyces)**

Le gène d'ADNr 16S qui code pour l'ARNr 16 S (ARN ribosomique 16S) est l'un des gènes les mieux conservés dans les organismes procaryotes (Eubactéries et Archaea). Il a été choisi comme marqueur phylogénétique en constituant une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir à la fois comparer et différencier entre les bactéries. En effet, l'ADNr 16S : Comporte des séquences internes variables qui, une fois analysées, permettent de distinguer les espèces des bactéries entre elles et de les classer en fonction de leur phylogénie. Il est d'une taille suffisamment courte (1500 pb) pour être analyser rapidement (**Boussaber et al., 2013**). Cette séquence du gène de l'ARNr 16S est même utilisée comme amorce pour identifier le genre *Streptomyces* à l'aide d'une amorce spécifique (identification du genre ou de l'espèce sans séquençage).

L'application des techniques comme l'RFLP (**Lanoot et al ., 2005**) et la RAPD sur ce gène , conduisent aussi à l'identification des collections de *Streptomyces* (**Martin et al., 2000 ; Rintala et al., 2001**).

##### **1.4.1. Limites de la PCR universelle 16S en tant qu'outil de définition de nouvelles espèces bactériennes.**

Depuis les recommandations émises en 2002 par le comité Stackebrandt pour la description de nouvelles espèces (**Stackebrandt et al. 2002**), il n'y a plus eu de recommandations pour la définition taxonomique des nouvelles espèces. Après avoir corrélé chez de nouvelles espèces décrites les pourcentages d'hybridation ADN-ADN aux pourcentages de similarité, d'autres auteurs ont proposé qu'une souche présentant un seuil de similarité inférieur à 99% avec l'espèce la plus proche (et non plus 97%) soit une souche candidate pour une nouvelle espèce (**Stackebrandt et Ebers, 2006**),

mais il n'y a pas de consensus sur ce point. Si le 16S reste un outil de découverte majeur de nouvelles espèces, sa place dans la description de ces nouveaux taxons est débattue. En effet les auteurs s'accordent sur la nécessité d'inclure une séquence de 16S d'au moins 1500 nucléotides dans la description d'une nouvelle espèce (**Stackebrandt et al. 2002**), mais certains pensent que la description des nouvelles espèces et la taxonomie bactérienne doivent se baser sur une séquence génomique complète (**Coenye et al. 2005**). Le nombre minimum de souches à étudier pour décrire une nouvelle espèce reste débattu. Si certains proposent qu'un minimum de cinq souches distinctes soient étudiées pour décrire une nouvelle espèce (**Janda et Abbott, 2002**), d'autres auteurs émettent des réserves sur cette règle. En effet, pour des espèces émergentes encore très rares, il faudrait des années pour isoler cinq souches distinctes, ce qui retarderait d'autant la description de ces nouvelles espèces (**Drancourt et al. 2004 ; Drancourt et Raoult, 2005**).

### **1.5. Hybridation ADN-ADN**

Elle est l'une des techniques utilisées pour la différenciation entre les espèces et pour la taxonomie des *Streptomyces* ; cette technique, selon les études est presque similaire à la taxonomie numérique. Il a été démontré que les Streptomycètes présentent une instabilité génétique considérables supportent l'hybridation ADN-ADN. Mais l'hybridation peut être influencée par la présence de larges plasmides chez les *Streptomyces* (**Kieser et al., 2000**).

Depuis plus d'une décennie, 03 génomes de trois espèces de *Streptomyces* ont été complètement séquencés. IL s'agit de l'espèce *S. Coleicor A 3 (2)* (2002) ; *S .Avermitilis* (2003), *S. griseus* (2008) (**Zhon et al., 2011**). Les **Tableaux 06 et 07** représentent les différents génomes complets séquencés des espèces des *Streptomyces*.

**Tableau 06.** Des Séquences du génome total des espèces de *Streptomyces* disponibles dans des banques génomique.

Souches et espèces de <i>Streptomyces</i>	Numéro d'accession
<i>Streptomyces albus</i> J1074 ( <b>Zaburannyi et al., 2014</b> )	CP004370
<i>Streptomyces avermitilis</i> ( <b>Omura et al. 2001 ; Ikeda et al., 2003</b> )	AP005645, BA000030
<i>Streptomyces bingchenggensis</i> BCW 1 ( <b>Wang et al., 2010</b> )	CP002047
<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8057 (non publier)	CP003219, CP003229
<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8057 ( <b>Barbe et al., 2011</b> )	FQ859184, FQ859185
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) ( <b>Bentley et al., 2002</b> )	AL589148, AL645771, AL645882
<i>Streptomyces collinus</i> Tu 365 ( <b>Rückert et al., 2013</b> )	CP006259, CP006260, CP006261
<i>Streptomyces davawensis</i> JCM 4913 ( <b>Jankowitsch et al., 2012</b> )	HE971709, HE971710
<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331 (non publier)	CP002475, CP002476, CP002477
<i>Streptomyces fulvissimus</i> DSM 40593 ( <b>Myronovskyi et al., 2013</b> )	CP005080
<i>Streptomyces griseus</i> NBRC 13350 (Ohnishi et al., 2008)	AP009493
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> jinggangensis 5008 ( <b>Wu et al., 2012</b> )	CP003275, CP003276, CP003277
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> jinggangensis TL01 (no publication)	CP003720, CP003721, CP003722
<i>Streptomyces</i> sp. PAMC26508 (non publier)	CP003990, CP003991
<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491 ( <b>Baranasic et al., 2013</b> )	CP006567
<i>Streptomyces scabiei</i> 87 22 ( <b>Bignell et al., 2010</b> )	FN554889
<i>Streptomyces</i> sp. SirexAA E (non publier)	CP002993
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712 ( <b>Pullan et al., 2011</b> )	FR845719
<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113 (non publier)	CP002994, CP002995, CP002996

**Tableau 07.** Travaux de séquençage du génome total de quelques espèces de *Streptomyces* (Harrison et Studholme , 2014)

Espèce et souche	Motivation de séquençage	Références
<i>S. albulus</i> CCRC 11814	Production d'un antibiotique ε-- Poly-L-Lysine	Dodd et al. , 2013
<i>S. albus</i> J1074 CP004370	hôte largement utilisé pour l'expression hétérologue de produits bioactifs naturels : génome de petite taille	Zaburanny et al., 2014
<i>S . albulus</i> PD-1	Produit des antibiotiques, la ε-poly-L-lysine et de l'acide poly-L-diaminopropionique	Xu et al., 2014b
<i>S .bottropensis</i> ATCC 25435	Production d'antibiotique bottromycin	Zhang et al., 2013
<i>S .collinus</i> Tu 365	Production d'antibiotique de la famille d Kirromycine	Ruckert et al., 2013
<i>S .exfoliatus</i> DMSZ 41639	Degrade le poly (3-Hydroxyalcanoate	Martinez et al., 2014
<i>S. fulvissimus</i> DSM 40539 <b>CP005080</b>	Production d'antibiotique inophore valinomycine	Myronovskyi et al., 2013
<i>S. ganicidicus</i> BKS 13-15	Inconnu	Kumar et al., 2013
<i>S. mabarensis</i> DSM 40847	Producteur industrielle de transglutaminase	Yang et al., 2013
<i>S. niveus</i> NCIMB 11891	Production de novobiocine, un antibiotique d'aminocoumarine	Flinspach et al ., 2013
<i>S.rapamycinicus</i> NRRL5491 <b>CP006567</b>	Production d'un médicament immunosuppresseur rapamycin	Branasic et al., 2013
<i>S.rimosus</i> ATCC 10970	Oxytétracycline	Pethick et al., 2013
<i>S.roseochromogene subs . ascitans</i> DS 12976	Production de Clorobiocin et l'antibiotique d'aminocomarine	Ruckert et al., 2014
<i>Streptomyces</i> sp. Mg1	Provoque la lyse et la dégradation des colonies de <i>Bacillus subtilis</i> et des cellules, séquencé à l aide de la plateforme PacBio	Studholme , 2014
<i>Streptomyces</i> sp. PRh5	Souche endophyte isolée à partir de racine de riz sauvage	Yang et al., 2014
<i>S. violaceusniger</i> SPC6	Tolérant aux multiples stresse: génome de petite taille	Chen et al., 2013
<i>S. viridochromogenes</i> Tu 57	Produire d'antibiotique de nature oligosaccharide :avilamycin	Gruning et al., 2013
<i>S. viridosporus</i> T7A	Degrade la lignine	Davis et al., 2013
<i>Streptomyces</i> sp. strain CFMR 7	Aptitude de dégradation de Caoutchouc	Nanthinia et al., 2015
<i>Streptomycessp.</i> M1013	Rhizosphère de <i>Medicago arborea</i> PGPR	(Drago Haas et al., 2017

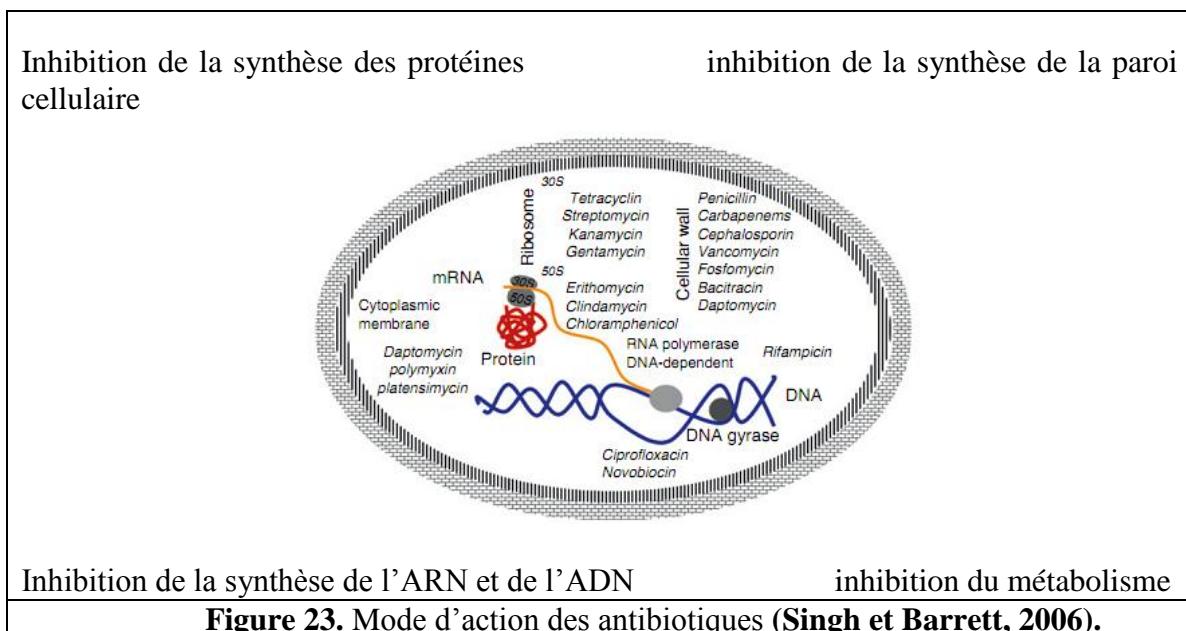
## VII. Les Antibiotiques

Les antibiotiques sont par définition des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer des micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (**Prescot et al., 1995**). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries.

### 1. Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie cibles (**Figure 23**).



### 2. Les antibiotiques produits par le genre *Streptomyces*

Les *Streptomyces* synthétisent des antibiotiques appartenant à différentes classes chimiques qui peuvent être des oligosides, des  $\beta$ -lactamines, des peptides, des tetracyclines, des anthracyclines, des ansamycines, des macrolides, des polyenes, des nucleosides et des fosfomycines (**Thomson et al., 2004**). Parmi les antibiotiques synthétisés par les *Streptomyces* : (streptomycine, kanamycine, chloramphénicol), des antifongiques (amphotéricine, candicine...), des antitumoraux (mitomycine, actinomycine...), des

antiparasitaires (hygromycine, salinomycine...), des antiviraux (Ara -C, tunicamycine), des insecticides (avermectine, milbémycine) et des herbicides (bialphos, phosphinothricine) (**Tiraby et Etienne, 1983 ; Bastide et al., 1986 ; Nolan et Cross, 1988 ; Lo et al., 2002 ; Rattanaporn et al., 2004; Oskay et al., 2004**). Les premières recherches menées sur la souche *S. griseus* a conduit à la découverte de la streptomycine, molécule active contre un grand nombre de bactéries Gram négatif, en 1944.

En 2002, le résultat du projet ACTINOGEN («Intégrer les applications basées sur la génomique pour exploiter les actinobactéries en tant que ressource pour les nouveaux antibiotiques» (**Bentley et al., 2002**). En 2003, (**Ikeda et al., 2003**). Il était possible d'obtenir le séquençage de *S. coelicolor* A3 qui a révélé 12 groupes de gènes "orphelins" dont la fonction est inconnue, mais largement étudiée, et les résultats obtenus sur ce groupe de gènes orphelins ont conduit à comprendre comment certains gènes abordent le métabolisme de la bactérie pour produire des métabolites secondaires dans des conditions de stress, par exemple en présence d'acides 2-alkyl-4- acides idrossimetilfuran-3-carboxylique.

### **3. Effet de la composition de milieux de culture sur la production des antibiotiques**

#### **a-Source de carbone**

La composition de milieu de culture a un rôle très important sur la production de biomasse et d'antibiotique, le **Tableau 08** montre l'effet de la source de carbone sur la production d'antibiotiques par des souches d'actinobactéries :

**Tableau 08 :** l'effet négatif sur la production d'antibiotiques chez les actinobactéries par les sources de carbone rapidement assimilables (**Chorin, 2009**).

Famille chimiques	Antibiotiques	Souches productrices	Sources de carbone ayant un effet négatif sur la production d'antibiotiques
<b>Polypeptides</b>	Actinomycines	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Glucose
<b>Aminoglycosides</b>	Gentamycine Kanamycine	<i>Micromonospora purpurea</i> <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Glucose, Xylose Glucose, Glycérole
<b>Macrolides</b>	Oléandomycine	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Glucose
<b>Nucléosides</b>	puromycine	<i>Streptomyces alboniger</i>	Glucose
<b>Anthracyclines</b>	Rétamycine	<i>Streptomyces olindensis</i>	Glucose

**b. Source d'azote**

La source d'azote apportée en culture microbienne est généralement l'ammonium ou des composés organiques comme les acides aminés. La forme sous laquelle l'azote est apporté à la culture influe et contrôle fortement les rendements de production des antibiotiques (**Strub, 2008**). Parmi les facteurs limitant la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*, on trouve les acides gras à courte chaînes, comme (acétate butyrate et propionate). **Khaoua, (1990)** a étudié l'activation enzymatique de ces précurseurs par deux systèmes enzymatiques (acyl-CoA synthétase, Kinase et une phosphotransférase). L'activité de ces enzymes est reliée avec la production de speramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Il a été montré qu'un excès d'ammonium dans le milieu de culture a un effet négatif sur la production de la spiramycine. Il agit entre autres, en freinant le catabolisme de la valine. Fournisseur principale de l'isobutyrate et du butyrate (acide gras à courte chaînes) précurseurs de la spiramycines.

**c. Source de phosphate**

Le phosphate inorganique inhibe la synthèse des antibiotiques chez les actinobactéries. La voie de pentose phosphate favorise la production d'antibiotiques, donc l'ajout de phosphate au milieu de culture pourrait favoriser le catabolisme des sources par la voie glycolytique ou dépend de la voie des pentoses phosphate. Cette dernière produit de fortes concentrations de NADPH nécessaires à la synthèse des antibiotiques.

Pour limiter l'impact du phosphate sur la production d'antibiotiques. Des ions sont ajoutés au milieu de culture pour complexer le phosphate. Par ailleurs. Les cultures sont réalisées à une concentration minimale en phosphate souvent limitant pour la croissance (**Chorin, 2009**).

**4. Stratégie moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne**

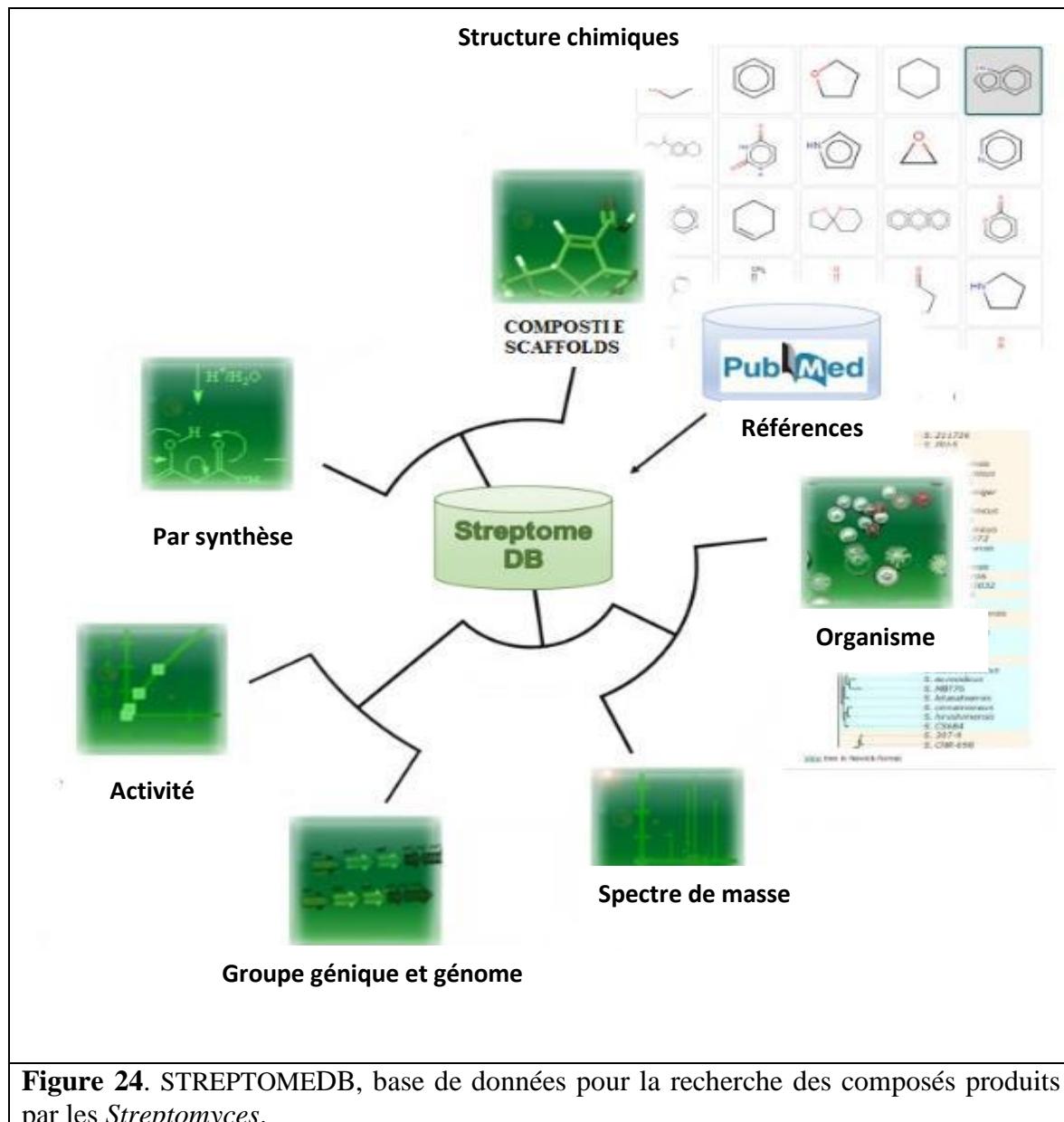
La montée des résistances contre les principales classes d'antibiotiques, en raison de l'utilisation imprudente et à la non-conformité du traitement antibiotique et face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de genre multirésistants, la découverte de nouvelles molécules d'antibiotique est devenue une nécessité absolue (**EcoAntibio 2017**).

D'ailleurs, certains travaux rapportent qu'en Europe, 4 millions d'infections par des germes résistant aux antibiotiques causent plus du 37.000 décès chaque année (<http://www.repubblica.it/salute/2016/05/19/news.it>).

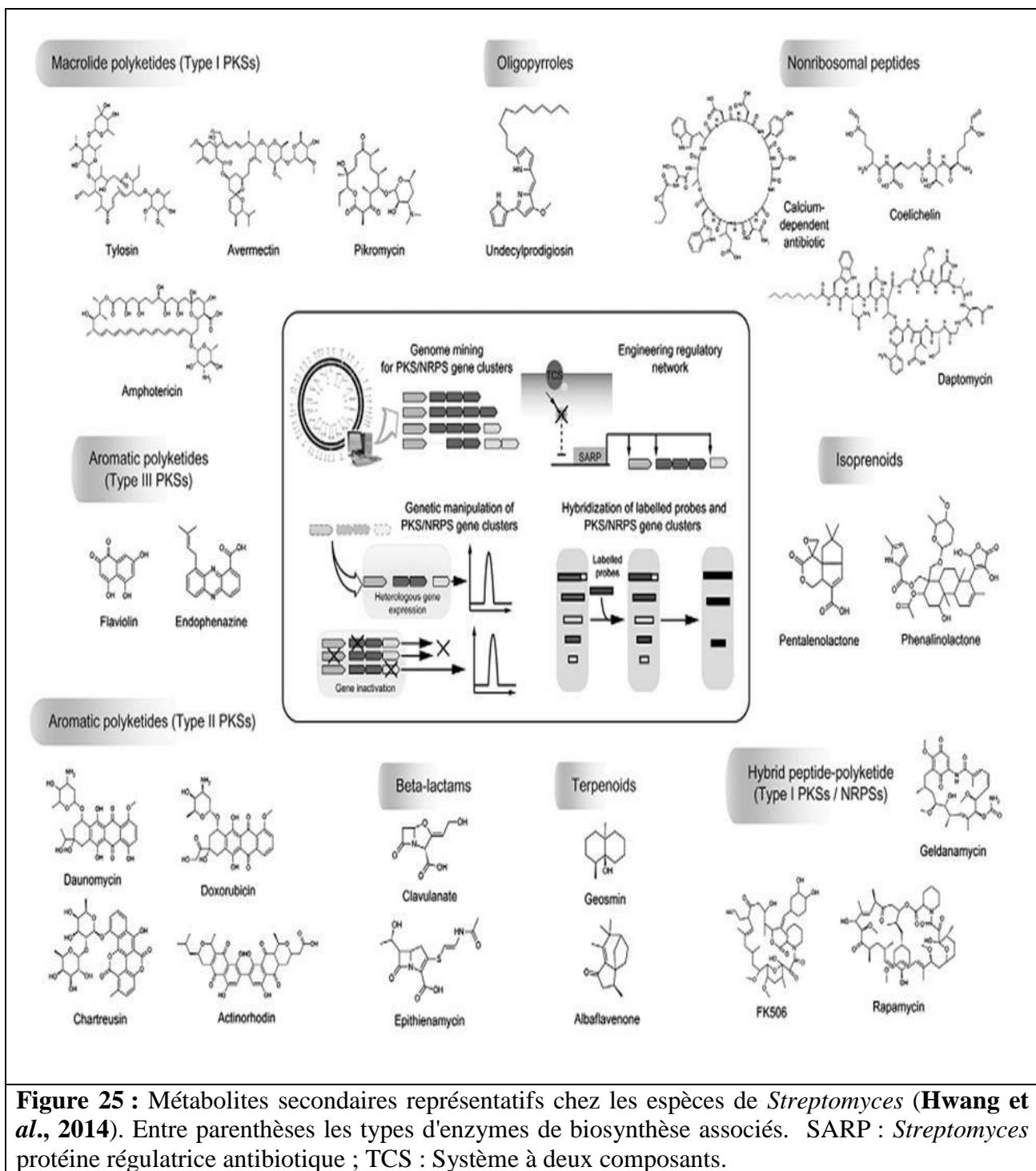
C'est pourquoi, il est important de recourir à de nouveau processus d'isolement, de purification et de caractérisation de nouveaux composés d'origine naturelle et provenant essentiellement des espèces de *Streptomyces*.

L'effort se concentre également sur des ressources innovantes, telle que l'HPLC, La RMN et l'introduction de bases de données utiles telle que **STREPTOME B (Klementz et al., 2016)**, Obtenu à partir de l'union de la nouvelle base de données des antibiotiques dans PubMed.

Cette base de données est considérée comme une source et une grande aide dans la recherche de nouveaux composés bioactifs (**Figure 24**). Aussi bien les différentes voies de la biosynthèse de ces molécules bioactives (**Figure 25**).



**Figure 24.** STREPTOMEDB, base de données pour la recherche des composés produits par les *Streptomyces*.



**Figure 25 :** Métabolites secondaires représentatifs chez les espèces de *Streptomyces* (Hwang et al., 2014). Entre parenthèses les types d'enzymes de biosynthèse associés. SARP : *Streptomyces* protéine régulatrice antibiotique ; TCS : Système à deux composants.

# **Matériel et Méthodes**

## **Chapitre II**

RappelGruit.Com

## I. Origine des échantillons de sol et isolement des actinobactéries.

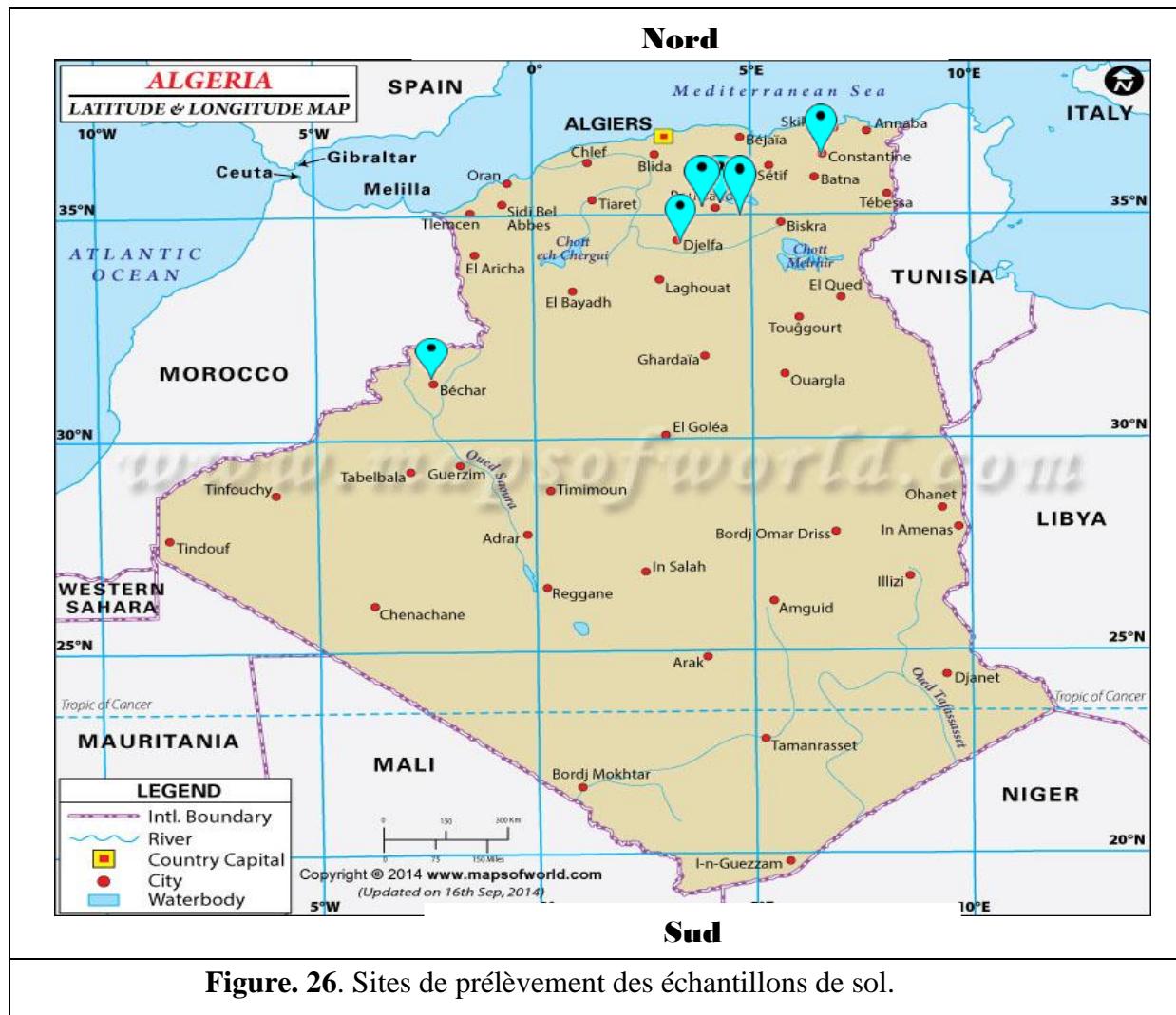
### 1. Les échantillons de sols

L'isolement des actinobactéries est réalisé à partir de six échantillons de sols non cultivés dans de régions arides et semi-arides d'Algérie. Les prélèvements ont été effectués entre la période du 30 Janvier 2013 et 28 Février 2013. Le **Tableau 09**, illustre les caractéristiques des échantillons de sol.

Les six échantillons de sols sont prélevés aseptiquement à une profondeur de 5 à 20 cm puis placés dans des sacs (ou sachets) stériles à raison de 250 g pour chaque échantillon. Ces derniers sont ensuite conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

**Tableau 09.** Situation géographique des stations d'échantillonnage pris par GPS.

Code de l'échantillon	Région	Altitude (mètres)	Latitude (N)	Longitude (E)	Etage bioclimatique
Ech 1	M'sila (Hammam Dhala)	772	35°55'41"	4°22'28"	Semi aride
Ech2	M'sila (Msife)	477	35°42'20"	4°32'30"	Aride
Ech 3	Djelfa	1138	34°40'22"	3°15'46"	Semi-aride
Ech 4	Okhdir (Béchar)	773	31°37'00"	2°13'00"	arides
Ech 5	Constantine (khroub)	574	36°21'54"	6°36'52"	Semi-aride
Ech 6	M'sila (Bou Saâda)	470	35°13'09"	4°10'54"	Semi arides



Les sites des prélèvements des différents échantillons sont représentés sur la carte géographique ci-dessous (**Figure 26**).



Zone d'échantillonnage

## 2. Isolement des actinobactéries

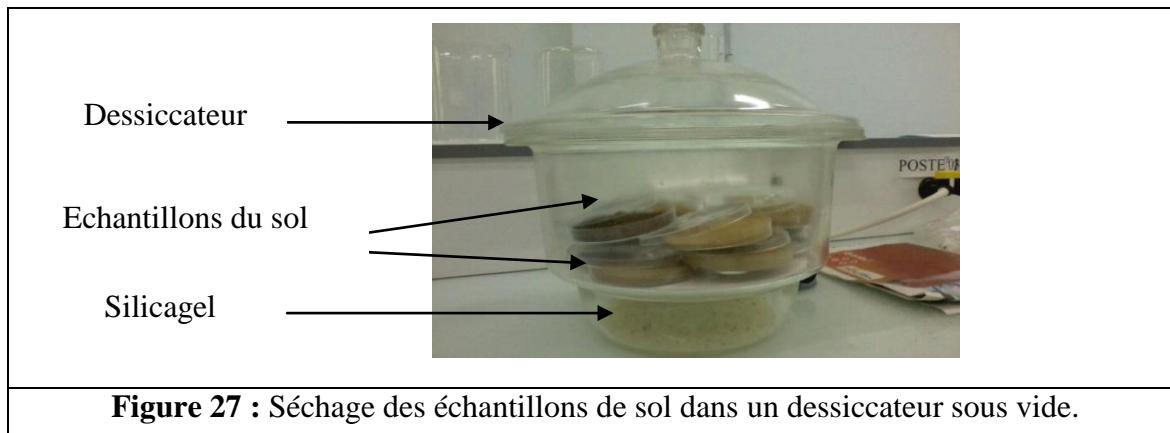
Les échantillons de sol ont été tout d'abord séchés puis broyés afin de faciliter l'isolement des bactéries.

### 2.1. Prétraitement des échantillons de sols

Les échantillons de sols ont subi un prétraitement afin d'éliminer certaines bactéries indésirables et favoriser la croissance des actinobactéries. Pour ce faire, deux procédés ont été appliqués.

**A / Le séchage :** Les échantillons de sols sont séchés à la température ambiante pendant sept jours ou dans un dessiccateur sous vide (**Figure 27**).

Ce prétraitement a comme effet, la réduction de la flore bactérienne indésirable, excepté les actinobactéries, résistantes à ce genre de traitement (**Suwani et al., 2012**).



### B / L'enrichissement des échantillons par le bicarbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) :

Cette méthode consiste à mélanger 10 g d'échantillon de sol avec 1 g de  $\text{CaCO}_3$ ; le mélange est incubé dans une étuve à 40°C pendant 7 à 9 jours dans une atmosphère saturée d'humidité. Ce prétraitement a pour avantage, la réduction de la flore fongique ainsi que l'augmentation du nombre d'actinobactéries (**Arshad et al., 2012**).

## 2.2. Les milieux de cultures utilisés

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des actinobactéries sont :

- **Milieu GLM** (Gélose à l'extrait de levure-Extrait de Malt (**Kitouni et al., 2005**)).
- **Milieu ISP2** (International *Streptomyces* Project) (**Ara et al, 2012**).

La composition de ces deux milieux de culture est présentée en **Annexe I**. Après autoclavage et refroidissement des milieux à une température d'environ 45°C, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'actidione et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de rifampicine ont été aseptiquement supplémenté au milieu de culture.

L'addition de ces deux composés (actidoine et rifampicine) permet d'une part de réduire la flore fongique et d'autre part de diminuer l'effectif bactérien (Gram Negative).

## 2.3. Préparation de la suspension-dilution et ensemencement

La méthode d'isolement utilisée est celle des suspension-dilutions (**Rapilly, 1968**) ensuite étalée sur le milieu approprié, coulé en boîte de Pétri stériles. La suspension mère est préparée par addition de 5 g de terre fine (traité selon le procédé précédemment cité) dans un 45 mL d'eau distillée stérile correspondant à la dilution mère.

Une série de dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  et ensuite préparée, après homogénéisation de la dilution de départ à l'aide d'un vortex (**Bastide, 1986 ; Kitouni, 2007**).

100 µl des deux dernières dilutions ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) sont étalées à la surface des milieux de culture et trois répétitions par dilution sont réalisées ou bien 1 mL est mis en masse avec le milieu ISP2 en surfusion. Les boites ainsi ensemencées sont ensuite mises à incuber dans une étuve à  $28\pm 2^\circ\text{C}$  pendant 7 - 21 jours (**Rahman et al, 2011**).

Dans le but d'isoler des souches bactériennes intéressantes, deux méthodes d'ensemencement ont été appliquée.

### **2.3.1.-Ensemencement en masse**

Cette méthode consiste à déposer tout d'abord 01 mL de la dilution  $10^{-4}$  ou bien  $10^{-5}$  dans une boite de Pétri, puis coulé environ 15 mL de milieu ISP2 ou GLM en surfusion. Les boites sont agitées par un mouvement circulaire lent afin d'homogénéiser le contenu des boites, ensuite incubées à  $28\pm 2^\circ\text{C}$  pendant 07 - 21 jours.

### **2.3.2.-Ensemencement en surface**

Cette méthode consiste à déposer 01 mL de dilution  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  de chaque échantillon à la surface du milieu de culture ISP2 gélosé ou GLM, puis étalé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les boites sont incubées pendant 7-21 jours à  $28\pm 2^\circ\text{C}$ .

## **3. Reconnaissance des actinobactéries**

Lors de l'incubation, les boîtes de Pétri ensemencées sont périodiquement examinées à l'œil nu et au microscope optique (grossissement x10 et x40), afin d'observer la morphologie des colonies d'actinobactéries. Les observations permettent de reconnaître les isolats bactériens recherchés. Les caractéristiques morphologiques et culturales permettant la reconnaissance des actinobactéries sont soigneusement étudiées. Selon certains auteurs, ces colonies bactériennes sont incrustées dans les milieux de cultures, avec un aspect farineux corné au bord frangé au centre proéminent (**Girard et Rougieux, 1967**).

## **4. Dénombrement et sélection des actinobactéries**

Les colonies bactériennes présentant les caractéristiques précédemment citées sont sélectionnées puis dénombrées (nombre des colonies par échantillon). Une moyenne des colonies bactériennes est calculée pour chaque milieu de culture (**Meklat, 2012**).

## **5. Purification et conservation des actinobactéries**

Les colonies sélectionnées sont prélevées délicatement à l'aide d'une anse stérile puis purifiées par stries sur milieu GLM ou ISP2.

Les isolats obtenus sont numérotés et, sont ensuite ensemencés dans des tubes à essai contenant le même milieu de culture en position inclinée. Les tubes sont incubés pendant sept jours à 28°C puis conservés à 4°C (**Arifuzzaman et al., 2010**). Les isolats sont régulièrement repiqués sur milieu ISP2 chaque 02 mois.

## **II. Criblage de l'activité antimicrobienne des actinobactéries**

Le criblage des isolats d'actinobactéries par rapport à leurs propriétés antibactériennes et antifongiques permet de sélectionner les isolats possédant les activités antimicrobiennes les plus intéressantes. Ces isolats feront l'objet d'une étude ultérieur plus approfondie.

### **1. Souches de microorganismes-cibles**

Les microorganismes cibles proviennent de la collection du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Mohamed BOUDIAF de M'sila, dont la majorité est catalogué et déposé dans la banque de données de la collection mondiale (souches ATCC). Les milieux utilisés pour la purification et l'obtention des cultures jeunes des germes cibles sont le milieu PDA pour les champignons, la gélose nutritive pour les bactéries et les levures. Le **Tableau 10**, présente les caractéristiques de ces microorganismes.

Les souches bactériennes et les levures ont été réactivées dans 9 mL de bouillon nutritif, puis incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et 3 à 5 jours pour les levures. Les souches fongiques ont été repiquées sur milieu PDA.

Le choix des souches inductrices a été basé sur leur pouvoir pathogène vis-à-vis de l'être humain et les plantes ainsi que pour leur rôle dans la détérioration des aliments durant la conservation.

**Tableau 10.** Caractéristiques des souches indicatrices

Microorganismes	Coloration de Gram	Origine
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram Positif	ATCC* 44300
2. <i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 25923
3. <i>Staphlococcus epidermidis</i>		ATCC 1222
4. <i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212
5. <i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 533
6. <i>Bacillus cereus</i>		ATCC 10876
7. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram Négatif	ATCC 43816
8. <i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922
9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 82827
10. <i>Salmonella enterica</i>		ATCC 14028
11. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levures	ATCC 4226
12. <i>Candida albicans</i>		ATCC 10231
13. <i>Fusarium culmorum</i>	champignons phytopathogènes	INPV
14. <i>Verticillium dahliae</i>		INPV
15. <i>Fusarium oxysporum f. sp. albedinis</i>		INPV

**ATCC\***: American Type Culture Collection,

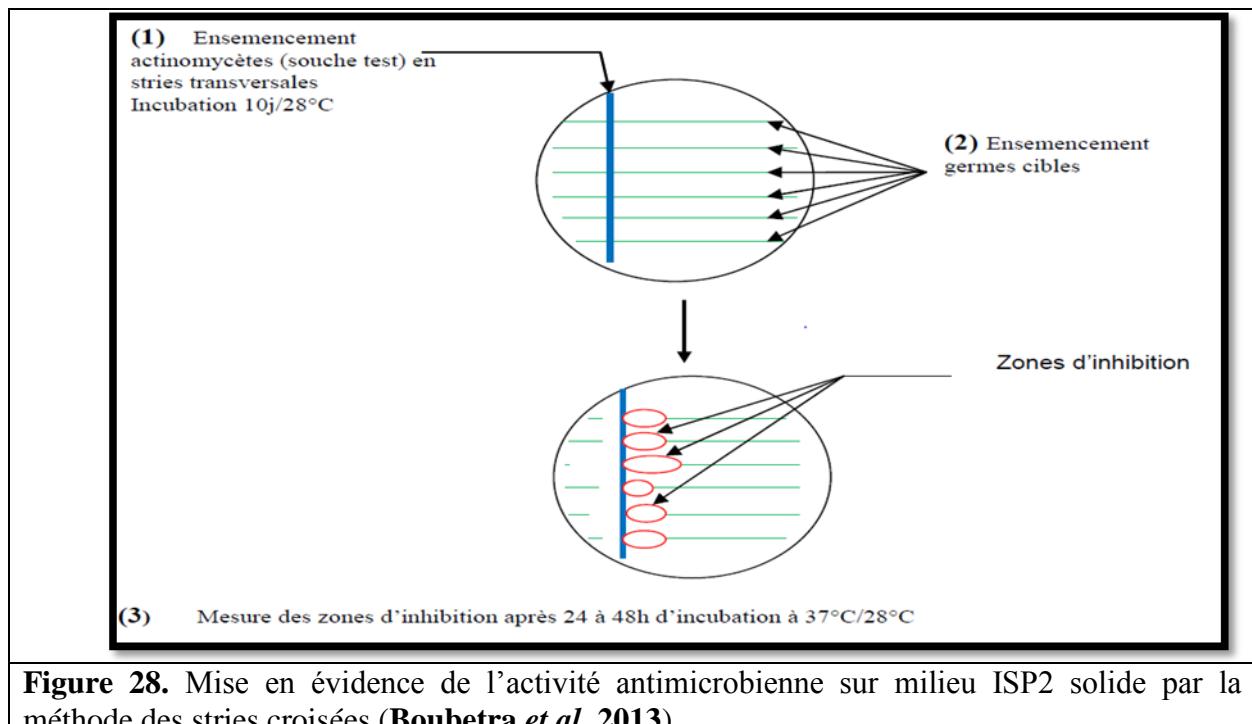
**INPV** : Institut Nationale de Protection des Végétaux

## 2. Tests d'antagonismes (étude de l'activité antagoniste *in vitro*)

L'activité antimicrobienne des actinobactéries est évaluée par deux méthodes couramment utilisées.

### 2.1. Méthode de stries croisées

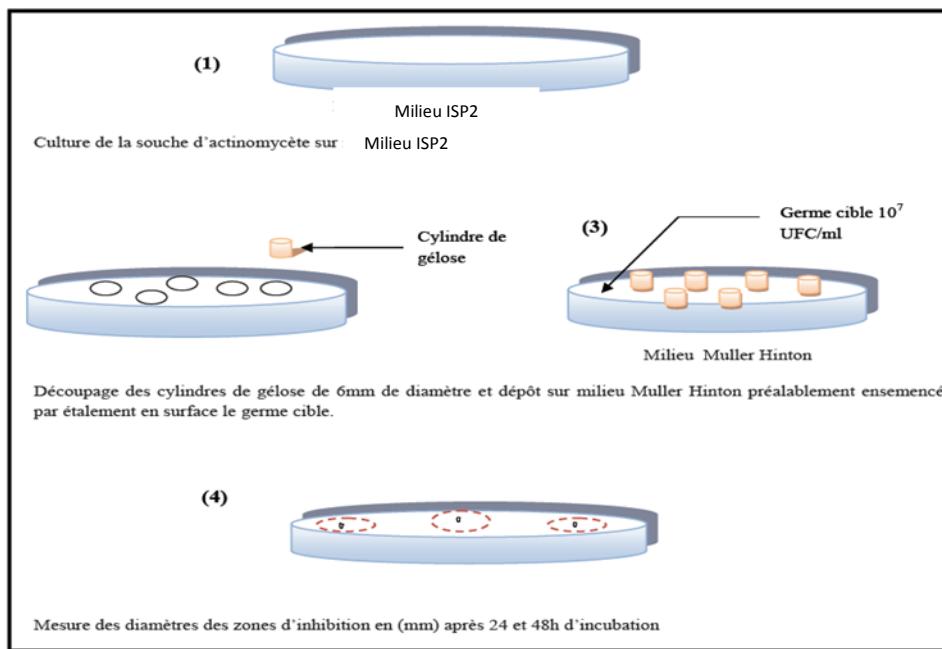
Cette méthode préconisée par **Boubetra et al., 2013** consiste à ensemencer la souche d'actinobactérie en un seul trait à la surface du milieu solide ISP2 et en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation de l'actinobactérie pendant 10 jours à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , les microorganismes cibles sont ensemencés perpendiculairement à la strie longitudinale de la souche d'actinobactérie (**Figure 28**). La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition entre la bordure de l'actinobactérie et la souche- cible, après 24 h d'incubation pour les bactéries, et 48h et 72h respectivement pour les levures et les champignons.



**Figure 28.** Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide par la méthode des stries croisées (**Boubetra et al, 2013**).

## 2.2. Méthode des cylindres d'agar

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries a été également réalisée par la méthode des cylindres d'agar sur milieu Mueller-Hinton. Cette méthode consiste à ensemencer les isolats d'actinobactéries en stries très serrées à l'aide d'une anse stérile et d'une manière homogène à la surface du milieu ISP2. Les boîtes sont incubées à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 14 jours (**Meklat, 2012**). Après incubation, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont découpés aseptiquement à l'aide d'un emporte pièce puis déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton, préalablement ensemencé par le germe cible (**Djinni, 2009**). Les isolats d'actinobactéries libèrent leurs métabolites secondaires dans le milieu au cours de leur croissance. Les boîtes ensemencées sont maintenues à  $4^\circ\text{C}$  pendant 2h avant d'être incubées à  $37^\circ\text{C}$ . Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ . La **Figure 29** illustre les étapes de la méthode.



**Figure 29 :** Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (**Bastide et al., 1986 ; Lemriss et al., 2003**).

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des actinobactéries vis-à-vis des champignons phytopathogènes nous avons réalisé la méthode suivante :

### 2.3. Méthode de confrontation directe en boîte de Pétri

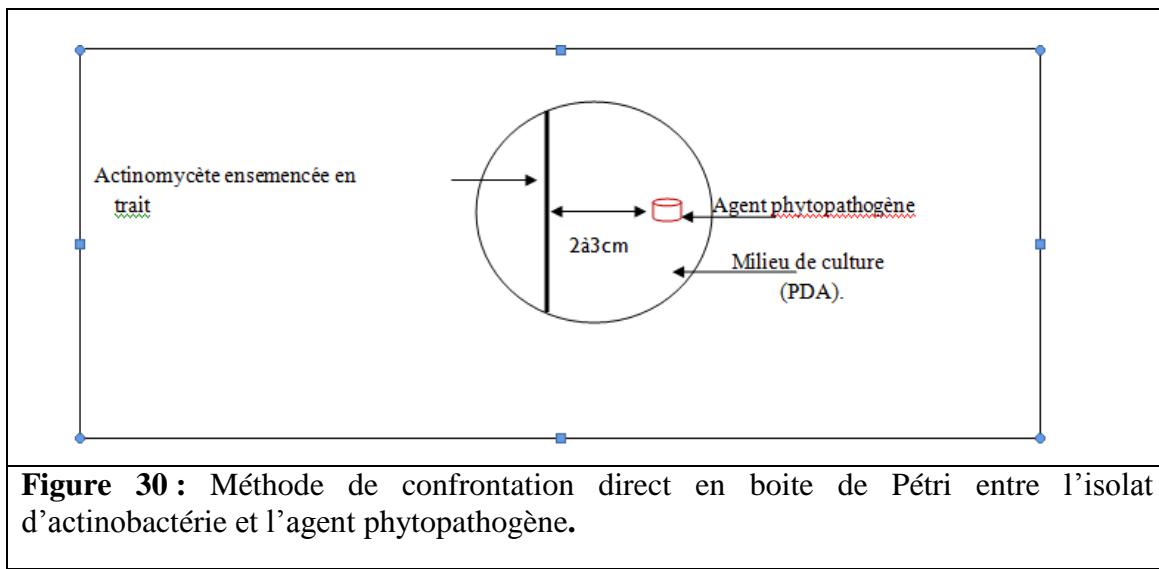
La capacité des souches bactériennes à inhiber la croissance des champignons phytopathogènes a été testée par la méthode de confrontation directe en boite de Pétri sur milieu PDA (**Inam-ul-Haq et al., 2003**). Le principe de la méthode est d'ensemencée la souche bactérienne en trait à l'aide d'une anse stérile. Après incubation à 30°C pendant 48h, une pastille mycélienne de 08 mm de diamètre prélevée au bord d'une jeune colonie fongique âgée de 7 jours puis déposée à environ 3 cm de la souche antagoniste testée (**Figure 30**).

L'incubation des boîtes est effectuée à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  à l'obscurité pendant 10 jours. Pour chaque essai, le dispositif expérimental est répété trois fois.

#### -Lecture des résultats

L'inhibition de la croissance fongique a été évaluée par le calcul du pourcentage de réduction de la croissance mycélienne est estimée selon la formule suivante (**Wang et al., 2002**) : (%) inhibition =  $(R_1 \text{ témoin} - R_2 \text{ test}) / R_1 \text{ témoin} \times 100$  Où,  $R_1$  témoin : distance radiale (en mm) de la croissance mycélienne en absence de la souche antagoniste (contrôle).

$R_2$  test : distance radiale (en mm) de la croissance mycélienne en direction de la souche bactérienne. Il est à noter qu'à partir de 20%, on peut parler d'inhibition.



### 3. Choix des meilleurs isolats d'actinobactéries antagonistes

Les isolats retenus sont ceux qui expriment les meilleurs résultats des tests de l'activité antimicrobienne (diamètre supérieur ou égal à 15 mm vis-à-vis d'une large gamme de microorganismes cibles).

### III. Etude de l'activité antibiotique de la souche sélectionnée « D2 »

L'isolat d'actinobactérie « D2 » a été sélectionnée comme meilleur isolat antagoniste afin d'étudier ces composés actifs.

**Rapport-gratuit.com**

#### 1. Cinétiques de production des antibiotiques en milieu liquide

La cinétique de production des métabolites suspecté (antibiotique) a été réalisée dans le milieu de culture ISP2 et Bennet à pH 7,2.

#### III.2. Préparation de pré-culture

Pour obtenir une pré culture, les spores sont utilisées pour inoculer des tubes contenant chacun 03 mL de milieu ISP2. Les tubes sont ensuite incubés à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  et maintenus en agitation dans un shaker à 220 rpm pendant 48 heures.

##### III.2.1. Ensemencement en fioles agitées

Des Erlenmeyer de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu ISP2 liquide (pH : 7,2) sont ensemencées par un inoculum bactérien (01 mg d'actinobactéries) dans 3 mL d'ISP2 liquide. Les cultures sont incubées à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  et maintenues en agitation dans un Shaker à 220 rpm pendant 14 Jours.

### **III.2.2. Cinétique de production de la substance antimicrobienne**

La cinétique de la production des antibiotiques a été réalisée en vue de déterminer le temps de production optimale. L'évolution de cette production est évaluée par l'étude de l'activité antimicrobienne toutes les 24 heures et la mesure du pH pendant 12 jours. Des prélèvements sont effectués au cours de la fermentation toutes les 24 h dans des conditions aseptiques à partir des fioles maintenu en agitation. Le volume prélevé est généralement de 4 mL. Les résultats sont exprimés par la moyenne de deux mesures obtenues à partir de chaque Erlenmeyer.

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode des trous (Wu, 1984). Cette expérience est menée vis-à-vis de quelques souches bactériennes ATCC. Cette méthode consiste à préparer le milieu ISP2 ou Miller Hinton contenant 12g /l d'agar-agar (afin de faciliter la diffusion de l'antibiotique) maintenu en surfusion à 44 °C, est pré-ensemencé avec une suspension de micro-organismes cibles. Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification complète du milieu, des trous ont été conçus à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Un volume de 150 µl du surnageant de culture à analyser est prélevé stérilement à l'aide d'une micropipette (embout stérile) puis introduit dans le trou. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h afin de faciliter la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, les boîtes sont ensuite incubées à 37°C. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de l'auréole d'inhibition autour du trou après 24 h d'incubation pour les bactéries, 48 h pour les levures et 36 h pour les champignons) (Saadoun et Muhana, 2008; Gebreyohannes *et al.*, 2013).

### **III.2.3. Extraction de la substance antimicrobienne (filtrat de culture)**

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

Après une production optimale d'antibiotiques, les filtrats ont été répartis en 4 fractions de 50 mL, ces filtrats sont mélangés chacun avec un même volume de chacun des quatre solvants choisis, le *n*-hexane, le dichlorométhane, le *n*-butanol et l'acétate d'éthyle : mélanger dans une ampoule à décanter (V/V) pour obtenir les phases aqueuses et organiques.

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

#### **2.4. Choix de meilleur solvant d'extraction**

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

#### **2.5. Révélation microbiologique de la substance antimicrobienne « bio-autographie »**

La méthode utilisée pour la réalisation de la bioautographie (révélation microbiologique) et celle de **Betina, 1973**. C'est une révélation microbiologique des chromatogrammes. Elle consiste à détecter et localiser les taches séparées actives, présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leur RF (Rapport frontal). Les microorganismes cibles utilisés provenant de la collection de l'unité de microbiologie clinique et de virologie du centre hospitalo-universitaire de Sienne – Italie. Les caractéristiques de ces microorganismes sont présentées dans le **Tableau 11**.

Chaque plaque est ensuite placée horizontalement (en étant maintenue surélevée grâce à des baguettes en verre) dans une boite en polyéthylène (22 x 24 cm) dont l'atmosphère a été rendue humide avec du papier Joseph imbibé d'eau distillée stérile. Le dispositif est stérilisé sous UV à 254 nm durant 45 min. Parallèlement, 50 mL de milieu ISP2 (à raison de 7g/l d'agar), en surfusion à 45 °C sont incubés avec une suspension de microorganisme-cible (10<sup>8</sup>/mL).

Le milieu ensemencé est réparti à l'aide d'une pipette stérile sur les plaques de gel de silice sous forme de film fin et uniforme. Après solidification de la gélose, 2 à 3 gouttes d'eau

distillée stérile sont ajoutées au fond de la boite et sur la feuille de papier pour permettre de maintenir une atmosphère humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour empêcher la croissance du microorganismes- cible et permettre en même temps la diffusion des composés de la plaque de gel de silice dans la gélose. Les boites sont ensuite incubées à 37°C. La lecture se fait après 24h. Les zones d'inhibitions des taches actives sont observées et le Rf des antibiotiques est calculé selon la formule suivante :

Rf = Distance de migration entre dépôt et tâche active/distance de migration entre dépôts et front du solvant.

## **2.6. Origine et caractéristiques des souches bactériennes**

**Tableau 11 :** Souches bactériennes multi résistantes de référence utilisées dans ce travail.

<b>Coloration de GRAM</b>	<b>Souches</b>	<b>Espèces bactériennes</b>	<b>Caractéristiques</b>
GRAM -	044R	<i>K. pneumoniaea</i>	TiGE KpC+
GRAM -	MR 157on	<i>Acinetobacter baumannii</i>	FQr AGr ESCr NEMr (OXA /OXA- 58)
GRAM -	ATCC 25922	<i>E. coli</i>	Souche de référence, type sauvage
GRAM -	VR- 143 /97	<i>P. aeruginosa</i>	FQr AGr ESCr NEMr (MBL /VIM-1).
GRAM +	ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	VANr
GRAM+	ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	Souche de référence, type sauvage
GRAM+	USA 300	<i>S. aureus</i>	Clone épidémique, ST8, MR (SCCmec IV)
GRAM+	3851	<i>S. aureus</i>	Isolat clinique, MR, VISA
GRAM+	Mu50	<i>S. aureus</i>	Isolat clinique, VISA
GRAM+	Mu3	<i>S. aureus</i>	Isolat clinique, hVISA
GRAM+	USA 400	<i>S. aureus</i>	Clone épidémique, ST1, MR (SCCmecIV)
GRAM+	WIS	<i>S. aureus</i>	isolat clinique, MR (sccMEC V)
GRAM+	Si-BRC	<i>S. aureus</i>	isolat clinique, DAPr
GRAM+	Ar-RJ	<i>S. aureus</i>	Isolat clinique, MR (PVL)
GRAM+	FI-4	<i>S. epidermidis</i>	Isolat clinique, LNZr (CFR)
GRAM+	MR148	<i>E. faecalis</i>	Isolat clinique, VANr
GRAM+	MZN	<i>E. faecium</i>	Isolat clinique, VANr, TEICOr
GRAM+	ATCC 6633	<i>B. subtilis</i>	Souche de référence, type sauvage
GRAM+	ATCC 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Souche de référence, type sauvage

Légende : NEM<sup>r</sup>: résistance au Carbapenems (imipenem et /ou meropenem) ; ESBL, Béta-lactamase à spectre étendu ; MBL : metallo-béta-lactamase ; MR : résistance au méthiciliné ; FQ<sup>r</sup>,résistante aux fluoroquinolones; AG<sup>r</sup>, résistante au aminoglycosides (gentamicine, amikacine, et/ou tobramycine); ESC<sup>r</sup>, résistant à un large spectre céphalosporines; COL<sup>r</sup>, resistance au colistine; MR résistante methicilline ; VISA, sensibilité intermédiaire à la vancomycine; hVISA, sensibilité hétérogène et intermédiaire à la vancomycine; VAN<sup>r</sup>, résistante à vancomycine; TEICO<sup>r</sup> résistante à la teicoplanine; LNZ<sup>r</sup>, résistante au linezolide ; MR (*SCCmec* IV) : une *S. aureus* résistante à la méthicilline codé par l'élément génétique nommé Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* de type IV (*SCCmec* IV) ; ST1 et ST8 : le ST signifie ‘séquence Type’, chaque ST définit un clone de *S. aureus*.

## **2.7. Séparation de l'extrait brut sur chromatographie couche mince (CCM).**

Nous avons utilisé des plaques de gel de silice Kieselgel HF254-366 et des cuves de chromatographie ascendante. A l'aide d'une micro seringue, des volumes de 25 µl de chaque extrait organique sont déposés sur une plaque sous forme de spots. Les plaques sont séchées à froid à l'aide d'un séchoir ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec du solvant.

Les systèmes de solvants utilisés :

- Acétate d'éthyle-méthanol (AM) (100-15, v/v)
- Dichlorométhane –méthanol (96-4, v/v).

L'atmosphère des cuves de chromatographie contient 100 mL de système de solvants. Après développement et lorsque le front du solvant aura parcouru une distance d'environ 17 cm à partir du dépôt de l'échantillon, les plaques sont retirées des cuves puis séchées à température ambiante. Les chromatogrammes sont ensuite observés à l'œil nu et sous lumière ultraviolette pour localiser les taches présentant une absorbance à 254 nm ou une fluorescence à 365 nm.

## **III.2.8. Purification des antibiotiques par HPLC semi préparative**

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée comme moyen de purification finale des antibiotiques obtenus.

Le diapositif utilisé est un modèle « Proéminence UFC » Shimadzu.

L'appareil est équipé des éléments suivants :

- un module de communication des solvants,
- un dégazeur,
- une pompe avec une soupape de dosage et d'élution en gradient à basse pression,

-une unité pour l'auto-échantillonnage,  
-un collecteur de fractions,  
- un détecteur à réseau de diode UV (DAD),  
- une chambre thermostatée,  
-Une phase stationnaire: colonne inverse Chromolith®Performance RP-C18 Endcapped 100-4.6, Chromolith® Performance Semiprep RP-18 100-10.

- un logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données : « LabSolutions ».

Le débit d'élution utilisé est fixé à 1.2 mL/min, avec détection à 220 nm (longueur d'onde permettant de détecter l'ensemble des composés). Les extraits sont dissous dans 1 mL de méthanol ultra filtré à l'aide d'un filtre en PTFE (polytétrafluoroéthylène) hydrophobe avec une porosité de 0,45µm de diamètre. Les échantillons sont ensuite injectés dans l'appareil HPLC à raison de 10 et 20 µl par injection.

Les différentes fractions obtenues (matérialisées sous forme de pics sur les chromatogrammes sont récupérées séparément par évaporation du solvant sous vide à 40°C puis testées par antibiographie afin de localiser celles qui sont actives.

Les solvants et les réactifs utilisés pour la purification des antibiotiques par HPLC sont : l'eau distillée, le Méthanol de grade pureté ≥ 99,9% produit par Sigma-Aldrich ou Carlo Erba.

### **III.2.9. Etude spectrométrique du produit purifié**

#### **III.2.9.1. Spectrométrie de masse**

La technique utilisée est celle d'ESI-MS en mode positif, en mode négatif. Cette étude est réalisée sur un spectrophotomètre modèle "Agilent 1100 Series LC / MS", Agilent Technologies MSD, avec source d'électro- nébulisation adjacente (ESI), un analyseur du piégeage des ions relié à une pompe binaire et à un injecteur.

La technique permet d'analyser de très faibles quantités de produit. Dans ce cas, 20 µl d'une solution de fraction active sont utilisés. Ces analyses ont été réalisées au laboratoire de chimie de l'Université de Salerne - Italie.

---

## **IV. Taxonomie Polyphasique des isolats d'actinobactéries antagonistes choisis**

### **1. Etude morphologique**

#### **1.1 Etude macromorphologique et caractères culturaux**

L'étude macromorphologique consiste à déterminer la couleur du mycélium aérien (MA) et du mycélium du substrat (MS), à apprécier la croissance de la souche d'actinobactérie et à observer la production ou non de pigments diffusibles (autres que les mélanoïdes) dans le milieu. Ces caractéristiques sont notées après 7 à 14 jours d'incubation à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sur les milieux ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 préconisés par **Shirling et Gottlieb (1966)**, ainsi que sur le milieu Bennett (**Waksman, 1961**) et MPPM (**Marillize et al., 2015**). Les couleurs du MA et du MS sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Charts Illustrated with Centroid Color: ISCC-NBS) (**Kelly et Judd, 1996**). La production de pigments mélanoïdes par les isolats est observée après 3 à 5 jours sur les milieux MPPM et ISP7 (**Shirling et Gottlieb, 1966**). La composition des milieux de culture est donnée en **Annexe I**.

#### **1.2 Etude micromorphologique**

L'étude micromorphologique est essentielle pour la reconnaissance des genres, les isolats poussant sur les différents milieux cités précédemment ont été observés à l'aide d'un microscope optique Olympus aux grossissements x10 et x 40.

Ces observations sont effectuées directement sur les boîtes de Pétri pour ne pas altérer la structure des mycelia et des fructifications (Sporanges).

#### **1.3. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) (Tresner et al., 1961).**

Cette étude a été réalisée au Service de Microscopie Électronique du Laboratoire de Biophysique, Prato – Italie, sous la direction du Docteur Antonio.

Le principe de cette technique consiste àensemencer des boites de Pétri contenant un milieu de sporulation SFM (Mannitol farine de soya Agar (**Annexe I**) (**Hobbs et al., 1989**) à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, les isolats d'actinobactéries ayant manifesté une activité antibactérienne importante vis-à- vis des bactéries cibles.

Les boites de Pétri sont incubées à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 14 jours. La croissance des colonies bactériennes et leur couleurs sont appréciées du premier jour jusqu'à la 2<sup>ème</sup> semaine d'incubation.

Les colonies bactériennes sont ensuite prélevées puis imprégnées par trempage dans une solution de glutaraldéhyde à 3% ensuite incubées pendant 1h (ou toute la nuit) à 4°C. Après incubation une série de 3 lavages de 10 min sont effectuées dans quatre solvants : tampon phosphate Ph : 07, éthanol à 70%, éthanol à 95% et éthanol absolu, respectivement.

Avant l'observation microscopique électronique des cellules d'actinobactéries ces dernières subissent deux traitements successifs :

- Séchage par point critique
- Métallisation

#### **a. Séchage par point critique**

Le sécheur par point critique K850 Point Dryer permet le séchage des échantillons sans les détériorer. La chambre du sécheur est refroidie jusqu'à une température de -10°C puis est pressurisée en CO<sub>2</sub>. Une circulation de CO<sub>2</sub> liquide est générée de manière à remplacer tout l'éthanol. Lorsque tout le solvant est chassé, la chambre est chauffée : la température et la pression montent de manière à dépasser le point critique du CO<sub>2</sub> (P<sub>c</sub> = 74 bar, T<sub>c</sub> = 31°C). La chambre est dépressurisée tout en étant maintenue à une température supérieure à la température critique du CO<sub>2</sub>.

#### **b. Métallisation**

Lorsque les échantillons sont déshydratés, on enlève chaque colonie de leurs petites cuves puis on les transferts sur des blocs métalliques porte-objet. Les plots avec échantillons sont introduits dans l'enceinte du métalliseur dans laquelle on fait le vide. On laisse remonter un peu la pression en introduisant le gaz argon.

On applique un puissant champ électrique entre une cathode et une anode qui porte les plots avec échantillon. Les électrons libres entraînés en spirale par un système magnétique entrent en collision avec les atomes d'Argon, ce qui génère des ions Ar+. Ces actions sont accélérées vers la cathode qu'ils bombardent avec assez d'énergie pour arracher des atomes d'or qui tombent en pluie sur la surface des échantillons, formant ainsi une fine couche conductrice.

### c. Observation au Microscope électronique

Le MEB utilisé est un Tescan de modèle VEGA II LSU. Un faisceau électronique très fin (sonde) balaie, point par point et ligne après ligne, la surface de l'objet.

Diverses interactions entre les électrons incidents et la matière génèrent différents signaux utilisés pour construire des images tridimensionnelles de la surface des échantillons avec une résolution pouvant atteindre quelques nm.

## **IV.2-Etude physiologique des isolats d'actinobactéries**

Une série de tests physiologiques est effectuée pour la différenciation entre certains groupes d'actinobactéries. Différents tests ont fait l'objet de cette étude pour l'identification de nos isolats bactériens.

La composition des milieux de culture utilisés sont présentées en **Annexe I**. Tous les tests sont effectués en double.

### **2.1. Production de pigments mélanoïdes**

La mise en évidence de la production des mélanines (pigment brun diffusible) est réalisée sur milieu gélosé ISP7 et MPPM. Les isolats bactériens sont ensemencés en stries serrées sur ce milieu en boites de Pétri. Les boites sont incubées à  $28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$  et la production des mélanoïdes est appréciée après 03 à 5 jours d'incubation.

La pigmentation des milieux ensemencés est comparée avec ceux des milieux non ensemencés et incubés dans les mêmes conditions (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Margalith, 1992**).

### **2.2. Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone**

Les composés glucidiques (oses, diholosides, polyholosides,...) peuvent être dégradés par de nombreuses bactéries suivant deux grandes voies : l'oxydation (en aérobiose) et la fermentation (en anaérobiose).

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinobactérie en présence de composés glucidiques à raison de 10g /l, comme seuls source de carbone, additionnés au milieu ISP9 (**Annexe I**), (**Shirling et Gottlieb 1966**). Les isolats d'actinobactéries sont ensemencées en stries à l'aide d'une anse stérile à la surface du milieu gélosé en boite de Pétri. Le test est considéré comme positif lorsque la croissance est meilleure et nettement supérieure à celle du témoin sans sucre. Il est à signalé que beaucoup de milieux d'identification sont aujourd'hui miniaturisés sous forme de galeries d'identification qui permettent la mise en évidence d'une vingtaine de caractères biochimiques.

Les composés glucidiques et dérivés testés sont les suivantes : le fructose, lactose, le galactose, le glucose, l'inositol, le mannitol, le rhamnose, le raffinose, le saccharose et le xylose.

Ces composés glucidiques sont stérilisés à l'éther dans un erlenMyer stérile pendant une nuit sous hotte axénique, avant d'être ajoutés séparément et aseptiquement au milieu ISP9 à une concentration de 10 g/l.

### **2.3. Hydrolyse de l'amidon**

La gélose à l'amidon est une gélose nutritive, additionnée de 1 % (P/V) d'amidon soluble, elle permet de mettre en évidence la dégradation de ce polyholoside par les isolats bactériens. Chaque isolat étudié est ensemencé sur ce milieu en boite de Pétri. Les boites sont incubées à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 14 jours. La culture est ensuite recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. Les zones contenant de l'amidon se colorent en bleu (**Geraldine et al., 1981**).

### **2.4. Hydrolyse de la caséine**

La caséine, protéine de lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes. Chaque isolat bactérien testé est ensemencé sur milieu gélosé en biote de Pétri additionné de 2 à 5% de lait écrémé stérile. Les boites sont incubées à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours. L'observation des zones éventuelles d'éclaircissement, du milieu autour des colonies témoigne l'hydrolyse de la caséine (Caséinase +) (**Staneck et Roberts, 1974 ; Geraldine et al., 1981** ).

### **2.5. Hydrolyse de la gélatine (Test gélatinase)**

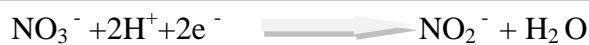
Plusieurs méthodes existent pour le test de gélatinase, dont la méthode lente sur milieu gélose nutritif contenant 0,4 % (P/V) de gélatine. Chaque isolat bactérien est ensemencé sur ce milieu en boites de Pétri. Les boites sont incubées à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 7 à 14 jours.

Les zones où la gélatine n'est pas dégradé s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure de mercurique est ajoutée (**Geraldine et al., 1981**).

### **2.6. Recherche de nitrate réductase**

Certaines bactéries ont la capacité de réduire les nitrates en nitrite puis parfois en diazote ( $\text{N}_2$ ). La production des nitrates réductase est mise en évidence dans un bouillon nitraté. L'isolat d'actinobactérie est ensemencé dans deux tubes contenant chacun 05 mL de milieu de culture, puis incubée à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

La lecture est effectuée après 5 et 10 jours d'incubation en ajoutant quelques gouttes (0,2 mL) des réactifs Griess I puis Griess II. L'apparition d'une coloration rouge franche immédiate, renseigne que la bactérie possède une nitrate réductase, qui catalyse la réaction :



Après la caractérisation physiologique des isolats d'actinobactéries présentant une activité antibactérienne, nous avons réalisé d'autres tests physiologiques.

Dans la nature ou dans un milieu de culture, les bactéries trouvent dans leur environnement des éléments nutritifs essentiels pour leur croissance. De surcroit, elles exigent parfois des éléments spécifiques ou facteurs de croissance (bases puriques et pyrimidiques, acides aminés, vitamines...). Tous ces besoins élémentaires et spécifiques des bactéries doivent être satisfaits sous certaines conditions physico-chimiques ( $T^\circ$ , pH, pression osmotique,...). Par ailleurs, ces conditions d'environnement peuvent être utiles dans l'établissement des conditions de cultures de bactéries.

## 2.7. Croissance en présence d'inhibiteurs (Résistance à divers agent chimiques)

Les tests réalisés consistent à évaluer la croissance bactérienne en présence de différentes concentrations de Na Cl (1% jusqu'à 10% p/v), de phénol (0,1% p/v), de l'Amoxicilline (50 µg/mL) de la pénicilline (10 µg/mL) et d'autres antibiotiques. Les antibiotiques et leurs concentrations sont présentés dans le **Tableau 12**. Les tests sont réalisés sur milieu de base Bennett en boites de Pétri, incubées pendant 7 jours à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 2.8. Croissance en présence de différentes concentrations de Na Cl

La majorité des bactéries, à l'exception de celles qui vivent dans des biotopes salés se développent en présence de faibles concentrations en sel. Le milieu Bennett liquide contenant des concentrations croissantes en Na Cl (1% jusqu'à 10%) (P/V) a étéensemencé par les spores prélevées d'une culture de 14 jours de l'isolat d'actinobactérie à identifier. L'incubation a été réalisée à la température de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 14 jours, puis la croissance a été notée (faible, moyenne, bonne et très bonne). La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la dernière concentration présentant encore une croissance (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

## **2.9. Croissance à différents pH**

En générale, les bactéries se multiplient bien dans des milieux neutres ou légèrement alcalins (pH 7 à 7,5) et ne supportent pas les pH acides sauf exception. Elles présentent un pH optimum de croissance généralement compris entre 6.5 et 7,5.

Un grand nombre d'entre elles tolèrent des variations de pH importants. Ce test consiste à évaluer la croissance des souches à différents pH dans un milieu Bennet liquide. La croissance des souches d'actinobactéries a été testée à pH allant de (3, 5, 7, 9 et 11) pendant 24 h à 48h d'incubation à  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  (**Meklat, 2012**).

## **2.10. Croissance à différentes températures**

Chaque bactérie a une température pour laquelle sa croissance est optimale, ainsi que des températures extrêmes au-dessous et au-dessus des quelles elle ne se développe pas. Ce test consiste à évaluer la croissance des souches à différentes températures sur le milieu ISP2. La croissance des souches d'actinobactéries a été testée à différentes températures (5, 25, 30, 40 et 50°C) pendant 7 jours (**Meklat., 2012**).

## **2.11. Tests de sensibilité aux antibiotiques**

Les antibiotiques antibactériens sont des substances dont l'action antibactérienne s'exprime, soit en inhibant la multiplication des bactéries, c'est l'effet bactériostatique ou bactériostase, soit en les détruisant, c'est l'effet bactéricide ou bactéricidie. Le test de sensibilité des bactéries aux antibiotiques est réalisé par la méthode de diffusion en gélose.

### **- Méthode par diffusion en gélose**

Lorsqu'on dépose un antibiotique sur un milieu gélosé en boite de Pétri, celui-ci va diffuser suivant un gradient de concentration. La bactérie ensemencée ne se développera pas pour les concentrations supérieures ou égales à la C.M.I. On observera alors une zone d'inhibition concentrique autour de l'antibiotique, dont le diamètre est lié à la plus ou moins grande sensibilité de la souche bactérienne. Cette méthode est réalisée pour tester la sensibilité des germes bactériens aux antibiotiques.

Les disques d'antibiotiques sont déposés aseptiquement à environ 10 mm de la périphérie de la boite, à l'aide d'une pince stérilisée par flambage, en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. Les boites sont placées dans un réfrigérateur à  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 2 h puis mises à incuber à  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré après 72 h d'incubation (**Chun et al., 1998; Monciardini et al., 2003**).

L’interprétation de l’antibiogramme est réalisée en utilisant différents antibiotiques, souvent utilisés pour ce groupe de bactérie. Les antibiotiques testés sont représentés dans le **Tableau 12**.

Les diamètres des zones d’inhibition circulaire autour des disques d’antibiotiques sont mesurés et comparés avec les résultats de standard. Q : diamètre de la zone d’inhibition Les résultats sont exprimés en terme de résistance ( $Q \leq 15\text{mm}$ ) sensibilité moyenne ( $Q=15 - 19\text{mm}$ ) ou sensible ( $Q \geq 20\text{mm}$ ) selon la Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (2012).

**Tableau 12 :** Différents antibiotiques sont utilisés dans le test d’antibiogramme.

Antibiotiques	Charge ( $\mu\text{g}/\text{disque}$ )
Erythromycine (ERY)	15
Pénicilline-G (P)	10
Spiramycine (SR)	30
Doxycycline (DO)	30
Streptomycine (S)	10
Chloramphénicol	30
Amoxicilline (AX)	25

### 3. Etude moléculaire

Les tests d’identification traditionnelle basés sur des essais minutieux et physiologiques ne donnent pas souvent de résultats précis et fiable pour la détermination précise des espèces bactériennes. Ces dernières années, plusieurs techniques moléculaires d’analyses de fragments d’ADN sont utilisées avec succès sur différents micro-organismes. Toutes ces techniques sont basées sur une amplification par PCR de l’ADN des microorganismes. Le mélange de fragments de produits PCR est ensuite analysé par les méthodes basées sur les séquences nucléotidiques des fragments (Aouiche *et al* 2015).

#### 3.1. Extraction de gène de l’ARN ribosomique 16S

L’ADN génomique est obtenu à partir d’une colonie d’actinobactérie cultivée sur milieu ISP2 solide et incubée à  $30^\circ\text{C}$  pendant 5 jours. La méthode utilisée pour l’extraction est celle d’ébullition. Les cellules bactériennes ont été bouillies dans  $300 \mu\text{l}$  d’eau distillée stérile pendant 15 minutes ; les surnageant ont été recueillis par centrifugation à  $10000 \times g$  pendant 5 min.

### 3.2. Quantification de l'ADN

Elle consiste à déterminer la quantité d'ADN présente dans les échantillons et la vérification de sa qualité. Un échantillon d'ADN extrait (2 µg/µl) est tout d'abord dilué 200 fois dans du tampon TE. Sa qualité est mesurée par un Nano Drop 2000c (10 ng/µl)

### 3.3.- Amplification par PCR et électrophorèse en gel d'agarose

La séquence partielle de l'ADNr 16S est amplifiée par PCR en utilisant un couple d'amorces universelle (**Tableau 13**). Le mélange réactionnel et préparé comme décrit dans le **Tableau 14**.

**Tableau 13 :** Séquences des amorces utilisées en PCR.

Amorces	Séquences
F - EubA2	5' – GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA- 3'
R - EubB2	5' - GAGAGTTGATYMTGGCTCAG' - 3'

**Tableau 14:** Composition du mélange réactionnel de PCR, volume final : 50 µl.

Réactifs	Volume (µl)
Tampon PCR (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 9,0 à 25°C)	5 µl
Mg Cl <sub>2</sub> (20 mM)	6 µl
d NTP (1.25 mM)	4 µl
Amorces (10 pM / µl)	4 µl
Taq DNA polymérase (0.3 U/µl)	0,2 µl
Extrait d'ADN (500 ng)	2 µl
Eau pure qsp	28,8 µl

Les conditions des cycles de PCR sont décrites dans le **Tableau 15**. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur « MYCLER » BioRad, Milano, Italy avec étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min. Puis trente-cinq (35) cycles d'amplification, avec une dénaturation à 94°C pendant 45 sec, l'hybridation à 54°C pendant 30 sec et une elongation à 72°C pendant 60 sec. Ensuite une étape d'extension finale est réalisée à 72°C pendant 05 min.

**Tableau 15 :** Conditions des réactions de PCR.

Nombres de cycles	Températures (°C)	Temps (secondes)
01	94°C	300 secondes
35 cycles	94°C 54°C 72°C	45 s 30 s 60 s
01	72°C	300 s

Après PCR, les amplifias obtenus sont visualisés sur gel d'agarose. L'électrophorèse sur gel d'agarose a pour but de séparer les fragments d'ADN, de vérifier leur qualité et de déterminer leur taille.

Un gel d'agarose (DNA grade, Euromedex) de 1.2% a été préparé dans TAE 1X (Tris-Acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), le tout est ensuite porté à ébullition afin de dissoudre l'agarose. Le gel est coulé sur la plaque d'électrophorèse horizontale. Des puits sont formés par positionnement d'un peigne afin de déposer les échantillons.

Après solidification du gel (environ 20 min), 05µl de chaque échantillon d'ADN génomique immergé dans le tampon est déposé dans l'un des puits. Pour que l'échantillon soit maintenu au fond du puits, il est alourdi avec un tampon de charge contenant 0,25% de bleu de bromophénol servant de marqueur de mobilité et 40% (w/v) de saccharose dissout dans de l'eau distillée stérile. Un marqueur de taille de "1Kb DNA Ladder Plus" (Promega, Madison, USA) est utilisé. L'électrophorèse dure environ 30 min, à (5 - 7 V / cm) à température ambiante.

Les bandes d'ADN sont visualisées grâce au bromure d'éthydium (BET) incorporé dans le gel lors de sa préparation selon les instructions du fabricant. C'est un agent mutagène, fluorescent sous lumière UV à 254 nm et qui s'intercale entre les acides nucléiques. Après migration des échantillons, le gel est déposé sur un transilluminateur (UV à  $\lambda = 302$  nm). Les bandes d'ADN sont alors visibles ; leurs tailles sont vérifiées et une photographie peut être prise avec un polaroïd.

### **3.4. Purification des produits PCR**

La purification des produits de PCR a été réalisée en utilisant le "**Wizard SVG**" et le kit de nettoyage PCR" (**Promega**). Cette purification a pour but de séparer les fragments d'ADN amplifiés du milieu réactionnel de PCR (Protéines, Sels) ainsi que des autres acides nucléiques (amorces non utilisées, amplification des séquences non désirées inférieures à 100 paires de bases). La qualité et la taille des produits de PCR purifiés ont été vérifiées par électrophorèse en suivant les mêmes conditions décrites ci-dessus.

### **3.5.- Séquençage de gène de l'ARN ribosomique 16S**

La séquence nucléotidique des produits PCR a été obtenue par la méthode de séquençage de Sanger (**Sanger, 1977**) par GATC Biotech Inc. (Constance, Allemagne). Les amorces utilisées pour déterminer la séquence nucléotidique étaient les mêmes que celles utilisées pour l'amplification PCR et pour l'analyse des produits séquencés.

Le logiciel Vector NTI Software 10.0 (**Life Technologies, Carlsbad, CA, USA**) a été utilisé, ensuite les alignements de séquences ont été réalisés à l'aide de BLAST software, disponible sur le site internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

### **3.6. Analyse phylogénétique**

Les séquences de gène ARNr 16S de nos isolats sont comparées, grâce au BLAST avec des séquences homologues des espèces de référence répertoriées dans les banques génomiques. Ces séquences sont alignées grâce au logiciel Clustal W. Ce dernier permet d'aligner successivement les séquences les plus proches en procédant de façon hiérarchique et d'obtenir un arbre phylogénétique basé sur l'homologie entre ces séquences. Les analyses phylogénétiques sont effectuées par la méthode de **Jukes et Cantor (1969)**(Mega soft) pour le calcul des matrices des distances d'évolution et l'algorithme du "Neighbor-Joining" (**Saitou et Nei, 1987**) et pour la construction des topologies des arbres phylogénétiques. La validation statistique des liens phylogénétiques établis est effectuée par le test du Bootstrap (**Felsenstein, 1985**).

### **3.7. Extraction de l'ADN génomique des isolats D2 et MS1 et séquençage**

L'ADN chromosomique des isolats D2 et MS1 a été purifié selon le protocole suivant : chaque isolat bactérien a été ensemencé sur milieu Jasenka (10% p / v de Saccarose, 3% p / v de bouillon de Tryptone de soja, 3% p / v d'extrait de levure, 1% de MgCl<sub>2</sub>) ensuite incuber à 30 °C pendant 40 h. 1 mL de chaque culture a été utilisée pour la récolte du mycélium par centrifugation à 10 000 x g pendant 10 minutes. Le mycélium obtenu a été dissout dans 500 µl de tampon SET (75 mM de NaCl, 25 mM d'EDTA, 20 mM de Tris HCl à pH 7,5, 50 mg / mL de lysozyme) puis incubé à 37°C pendant 1 heure. Une quantité de SDS de concentration finale de 1% avec 30 µg de Proteinase K et 25 µg d'ARNase a été ajoutée. Le lysat obtenu a été incubé à 55 ° C pendant 2 h sous une agitation douce. Puis un volume de 500 µl de Na Cl à 1,4 M a été ajouté, ensuite l'ADN a été extrait et déprotéiné en ajoutant 1 volume de phénol-chloroforme (1: 1, pH : 08) par centrifugation à 10 000 x g/ pendant 10 min. L'ADN précipité a été obtenu en ajoutant 2 volumes d'éthanol glacé puis séché à l'air puis dissout dans de l'eau distillée. La concentration d'ADN a été déterminée à l'aide d'un fluorimètre Qubit® (Invitrogen), selon les instructions du fabricant.

Le séquençage complet du génome a été réalisé par la Technologie Novogène de Bioinformatiques Co. L.t.d. (Hong Kong) à l'aide de la plate-forme HiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA) avec une approche à deux extrémités appariées de 2x250 pb.

Les séquences ont été assemblées à l'aide de SPAdes des versions 3.10.0 (**Bankevich et al. 2012**), avec une couverture de génome brute de (ca. 175x et 160 x) pour les deux isolats MS1 et D2 respectivement.

La comparaison de séquence a été effectuée en ligne à l'aide de l'outil BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). L'identification au niveau de l'espèce a été réalisé à l'aide du logiciel JSpecies version 1.2.1 (**Richter et Rosselló- Móra 2009**) et en utilisant les paramètres par défaut pour le calcul de l'identité moyenne des nucléotides avec Blast algorithme (ANIb) et avec la comparaison de la distance génome-génome (GGDC) en utilisant l'outil en ligne GGDC 2.1 (<http://ggdc.dsmz.de>) (**Meier-Kolthoff et al., 2013**). Les résultats de l'outil en ligne GGDC 2.1 ont été interprétés selon la formule 2 comme recommandé pour les génomes préliminaires.

# **Chapitre III**

## **Résultats et Discussion**

**PARTIE I : isolement des actinobactéries des sols arides et semi arides et évaluation de leur potentiel antimicrobien.****1. isolement et dénombrement**

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

Les colonies d'actinobactéries mycéliennes isolées apparaissent après 3 à 4 semaines d'incubation sur les milieux d'isolements (ISP2 et GLM) additionnés de 50 µg de rifampicine et d'actidione (**Annexe I**). Ces colonies sont reconnues par leur aspect macroscopique, des colonies de 1 à 7 mm, souvent compactes et bien incrustées dans la gélose, et présence en général d'un mycélium aérien et un mycélium du substrat appelé aussi mycélium végétative (**Figure 31**). Les colonies d'actinobactéries ont été purifiées par repiquage sur milieu ISP2 ou GLM et incubées à 28 °C pendant 7 à 21 jours.

Nous avons ainsi isolé 32 isolats d'actinobactéries dont, 04 isolats proviennent des sols de Hammame Dalaa et 03 isolats de Msif (Wilya de Msila), 06 isolats des sols de Djelfa, 05 isolats des sols de Béchar, 04 isolats de khroub (Constantine) et 10 isolats du sol de Boussaâda (M'sila). Cette population bactérienne présente une diversité culturelle (aspect, couleur et diamètre des colonies et quantité du mycélium aérien) (**Figure 32 et 33**) et morphologique (sporulation et présence du mycélium aérien et mycélium du substrat et fragmentation ou non de ce dernier). A travers ces résultats, le sol de Boussaâda situé dans la Wilaya de M'sila semble être le plus riche en germes d'actinobactéries. En revanche, le nombre des isolats obtenus à partir des autres sols était plus ou moins faible et ne dépassant pas 03 à 04 isolats par région.

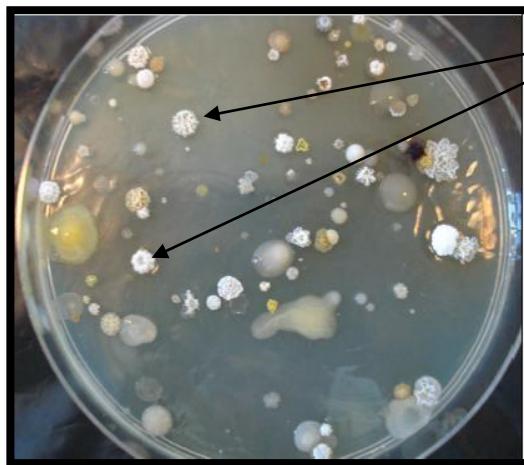
Les résultats montrent clairement, que le milieu GLM est le plus favorable pour l'isolement des actinobactéries à partir des échantillons de sols arides et semi-aride analysés.

Les isolats obtenus sont ensuite purifiés puis conservés soit à 4 °C sur des géloses inclinées avec un repiquage tous les deux mois (**Hilali et al., 2002**) soit à -20°C en suspension en présence de glycérol à 20% (v/v) (**Kitouni, 2007**).

Les résultats de l'isolement des actinobactéries à partir des 06 échantillons ainsi que leurs caractéristiques culturales sont présentés dans le **Tableau 16**.

**Tableau 16.** Nombre d'isolats d'actinobactéries isolés à partir des échantillons du sol.

Code de l'échantillon	Isolats d'actinobactéries	Diamètre des colonies (mm)	Couleur de mycélium aérien	Aspect des colonies
<b>Ech 1</b> (Hammam Dhalaa) Msila	<b>H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>,</b> <b>H<sub>4</sub></b>	<b>(2-7)</b>	Blanc cassé, gris, jaune Orangé.	Colonies bombées adhérents entre eux, présence de mycélium de substrat et de mycélium aérien, production des pigments diffusibles dans le milieu gélosé
<b>Ech2</b> (Msife) Msila	<b>MS1, MS2,</b> <b>MS10</b>	<b>(1-3)</b>	Blanc, gris, Marron.	Colonies de taille moyenne avec un contour arrondi, adhérent dans la gélose, présence de mycélium de substrat et de mycélium aérien, production des pigments mélanoïdes.
<b>Ech 3</b> (Djelfa)	<b>D1, D2, D3,</b> <b>D4, D5, D6,</b>	<b>(1-5)</b>	gris, blanc cassé, gris.	Colonies de différentes tailles, farineuses, aplatées avec des contours réguliers, présence de mycélium de substrat et de mycélium aérien. Absence de pigments.
<b>Ech 4</b> (Okhdir ) Bechar	<b>O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>,</b> <b>O<sub>4</sub>, O<sub>5</sub></b>	<b>(4-6)</b>	Blanc, gris, jaune Orangé et parfois marron.	Colonies de grande taille avec un contour arrondi, aplatis, poudreuses, présence de mycélium de substrat et de mycélium aérien. Production de mélanine.
<b>Ech 5</b> (lkeroube) Constantine	<b>C, C1, C2,</b> <b>C 3</b>	<b>(2-4)</b>	blanc, blanc cassé, gris foncé.	colonies grises foncées, adhérent entre elles, poudreuses. Présence de mycélium de substrat et de mycélium aérien. Absence de pigments.
<b>Ech 6</b> (Bousaâda) M'sila	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 , <b>10</b>	<b>(2-4)</b>	Blanc, marron foncé, crème et jaune Orangé.	Colonies moyennes, sous forme de chou-fleur, farineuses, poudreuses adhérent complètement dans la gélose, présence de mycélium aérien et de mycélium substrat. Production de mélanine.



Colonies d'actinobactéries

**Figure 31.** Boîte de Pétri représentant un isolement d'actinobactéries à partir d'un échantillon de sol de Boussaâda (Msila) (dilution  $10^{-4}$ ).

### Discussion

D'après certains auteurs, la technique universelle d'isolement des actinobactéries n'existe pas. De ce fait, il est recommandé de varier les méthodes et les milieux d'isolement dans un objectif de réussir à un isolement important de la flore d'ordre d'actinomycétale (**Boudemagh, 2007**). C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé deux milieux de culture accompagné de deux traitements des échantillons. Plusieurs auteurs considèrent que l'emploi d'antibiotiques est une précaution essentielle dans l'isolement des actinobactéries. Alors que d'autres, combinent un prétraitement chimique ou physique des échantillons avec l'addition des antibiotiques. Cette technique d'isolement influence considérablement la variation des genres d'actinobactéries isolés et peut être utilisée pour un isolement ciblé et spécifique de genre. **Larpent et Larpent-Courgaud (1997)** ont utilisé un milieu de culture supplémenté de 50 µg/mL de cycloheximide, 50 µg/mL de nystatine, 5 µg/mL de polymyxine et 1 à 8 µg/mL de pénicilline pour isoler les genres *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspera* et *Streptosporangium*.

Nos résultats illustrés dans le **Tableau 16** ont montré que le milieu GLM a permis l'isolement d'un nombre relativement acceptable de colonies d'actinobactéries à partir des différents sols par rapport au second milieu de culture (ISP2). Cette propriété peut être expliquée par la richesse de ce milieu en substrats carbonés (le glucose) et azotés (extrait de levure et peptone). Ces deux éléments semblent stimuler la croissance des actinobactéries et facilitent ainsi leur isolement.

Nos résultats sont en accord avec les travaux antérieurs réalisés sur les actinobactéries en affirmant que le nombre des actinobactéries est souvent corrélé positivement avec le taux

de la matière organique présente quel que soit le taux de la salinité du sol (**Lee et Hwang, 2002**).

Selon les travaux de **Sykes et Skiuuer (1973)** et **Basilio (2003)**, le nombre d'actinobactéries isolé est inversement proportionnel au taux d'humidité des échantillons analysés.

En revanche le milieu ISP2 a permis l'obtention d'un faible nombre d'isolats d'actinobactéries par rapport au milieu GLM. Il est important de souligner que plusieurs auteurs adoptent d'autres milieux d'isolement tel que le milieu Chitine vitamine B, caséine asparagine agar, afin d'augmenter les chances d'obtenir une grande variété de micro-organismes cible ou bien dans le but d'isoler des genres d'actinomycétales rares présentant des activités biologiques intéressantes (productions des nouvelles molécules bioactives). A titre d'exemple, le chloramphénicol, connu pour favoriser la sélection des *Streptomyces* (**Sabaou et al., 1998**), le lysozyme et le polymyxine B favorisent les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix*, ainsi que la novobiocine, connue pour la sélection des *Micromonospora* et des *Actinoplanes* (**Nekhili, 1996; Sabaou et al., 1998**).

Les conditions abiotiques contribuent elles aussi à l'obtention de ce groupe de bactérie ; la température adéquate pour les actinobactéries est de 28 à 30°C. Ce paramètre permet une meilleure croissance des actinobactéries. La durée d'incubation est également importante car la synthèse des métabolites secondaires par les actinobactéries suit la phase de croissance active qui dure 7 jours. De ce fait, il est recommandé de prolonger le temps d'incubation jusqu'à 21 jours pour que les micro-organismes puissent synthétiser les métabolites secondaires.

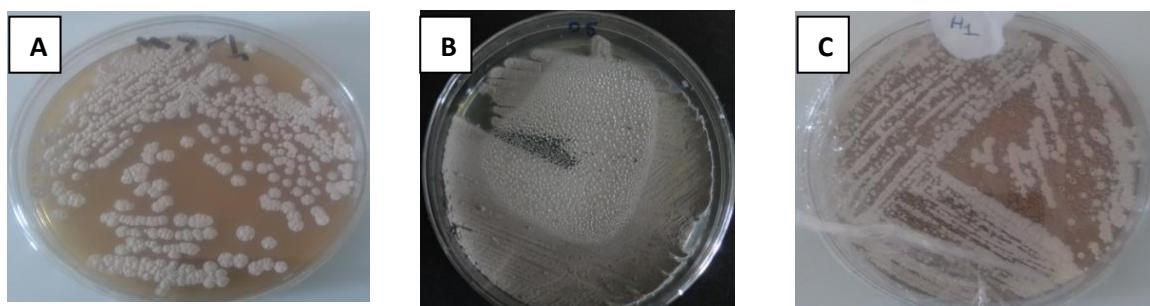
Les résultats illustrés dans le **Tableau 16**, indiquent une distribution homogène des actinobactéries isolés à partir des échantillons du sol. En effet, cela est probablement dû aux mêmes facteurs physico-chimiques précédemment cités, qui influent considérablement sur le nombre ainsi que le groupe des actinobactéries qu'abrite le sol (**Hop et al, 2012 b ; Adegbeye et al, 2012**). Selon **Lee et Hwang., 2002**, les trois facteurs écologiques les plus importants qui influent la diversité des actinobactéries dans le sol sont : le pH, la matière organique et le taux d'humidité. D'autres facteurs sont aussi important comme la température du sol, la nature du sol, la végétation et l'emplacement géographique (**Adegbeye et al., 2012**). D'autre part, l'addition d'agent antifongique et antibactérien vis-à-vis des bactéries à coloration Gram négative aux milieux de culture entraîne une augmentation du nombre de bactéries actinomycétales (**Takizawa et al., 1993**).

Si leur faible exigence et leur résistance semblent les sélectionner dans les sols soumis à des conditions écologiques sévères, l'aptitude de ces microorganismes à sécréter des substances bioactives, leur adaptation aux conditions hostiles suggèrent leur utilisation dans le domaine pharmaceutique (production d'antibiotiques).

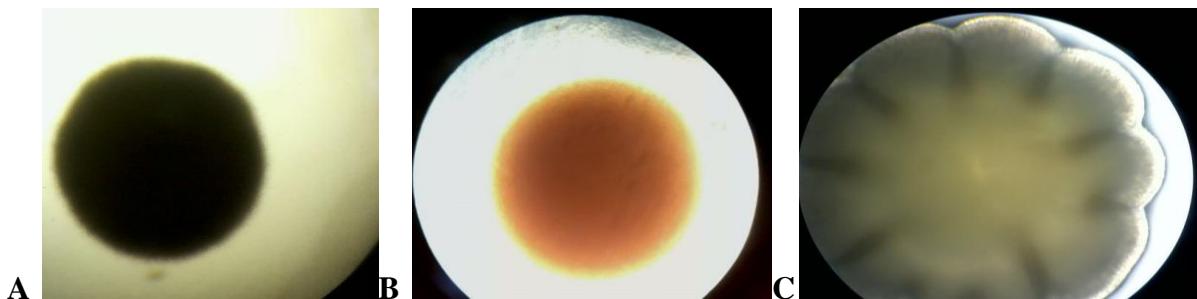
Il ressort de cette étude que les actinobactéries sont quantitativement parmi les habitants les moins importants des sols étudiés. Ceci pourrait être expliqué par la nature des sols étudiés et la période de prélèvement. Selon **Antoun et al., 1978**, les sols agricoles sont pauvres en actinobactéries et leur pourcentage varie entre 5 et 12%.

Le nombre d'isolat obtenu représente un faible taux d'isolement. Ce résultat peut-être expliqué d'une part par la période d'échantillonnage réalisée pendant la saison hivernale (Janvier et Février) et d'autre part, par les caractéristiques des échantillons de sols (secs, mal ventilés). **Lin et al., 2007** ont obtenu des résultats similaires dans un sol sablonneux en Chine. Selon les travaux de **Hiltner et Stromer (In Loqman, 2009)**, les actinobactéries représentent environ 20% de la flore microbienne du sol au printemps, alors qu'en automne la densité des actinobactéries dépasse les 30%. Cet accroissement est étroitement lié à la disponibilité des éléments nutritifs pour les germes microbiens. Tandis qu'en hiver, période d'échantillonnage, le nombre des actinobactéries diminue et atteint un pourcentage d'environ 13%. Selon certains auteurs, ce faible pourcentage est probablement dû à la diminution de la température du sol et à la présence des bactéries à coloration Gram positif telles que les espèces du genre *Bacillus* qui colonisent le sol et rend difficilement les isolements des actinobactéries.

L'addition d'antibiotique anti-Gram positif permet de réduire de façon considérable le nombre de ces bactéries, mais ces antibiotiques ne sont pas sans effets sur les actinobactéries qui appartiennent au groupe des bactéries à coloration Gram positif (**Kitouni, 2007**).



**Figure 32 :** Caractéristiques morphologiques et culturelles sur milieu ISP2 de 03 isolats d'actinobactéries obtenus de différents échantillons de sols. Colonies : **A**. blanchâtre ; **B** : grisâtre ; **C** : blanche rosâtre.



**Figure 33.** Colonies d'actinobactéries observées sous le microscope photonique (Gr. X400).

## 2 Résultats de l'action antagoniste des isolats d'actinobactéries

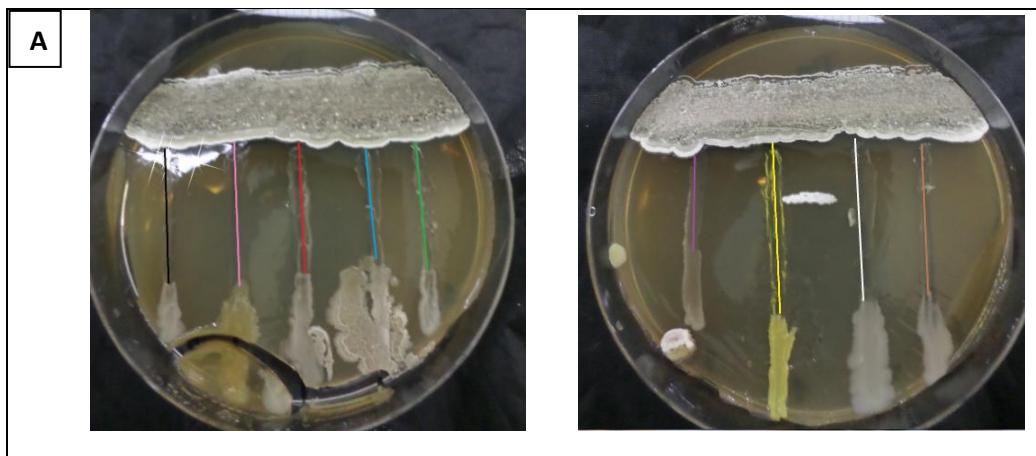
L'une des caractéristiques des actinobactéries et leur capacité à ralentir et/ou d'inhiber l'activité et la croissance des bactéries pathogènes. Dans cette optique, nous avons réalisé deux techniques classiques :

### 2.1 Technique de stries croisées

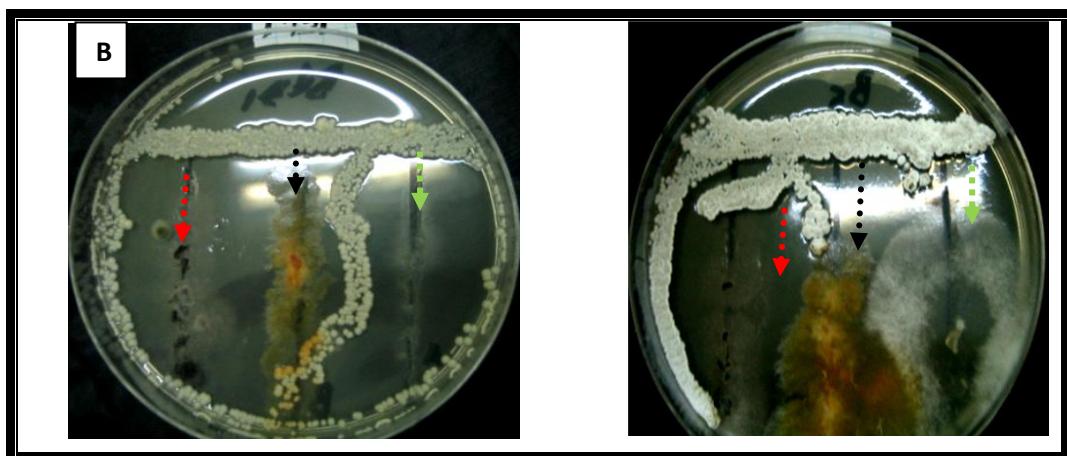
Les tests d'antagonisme *in vitro* des 32 actinobactéries vis-à-vis des microorganismes cibles sont effectués sur milieu ISP2 selon la technique de stries croisées. Cette méthode a permis de sélectionner les isolats présentant l'activité antimicrobienne le plus intéressante vis-à-vis des germes testés.

Les résultats de cette étude ont montré que tous les isolats testés se sont révélées actifs contre au moins deux microorganismes cibles (**Figure 34A et 34B**). Parmi les isolats d'actinobactéries testés, l'activité antagoniste la plus importante est présentée par les isolats D2, MS1, 10 et C. Ces isolats possèdent un pouvoir antagoniste vis-à-vis de la majorité des souches testées. Les autres isolats se sont révélés peu efficaces (**Tableau 17**). Ces quatre actinobactéries ont une action antibiotique vis-à-vis des souches cibles testées. Certains sont fortement ou moyennement actifs, d'autres le sont faiblement.

Ces quatre isolats ont été retenus pour la suite de notre travail afin de vérifier si leur pouvoir antibiotique s'étend à toutes les souches indicatrices.



**Figure 34 A.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'isolat **10** vis-à-vis de bactéries Gram + et Gram – et des levures par la méthode de stries croisés.



- *Verticillium .dahliae*
- *Fusarium culmorum.*
- *Fusarium Oryxsporum. f.sp. albedinis*

**Figure 34 B.** Mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode de stries croisées de l'isolat 10 vis-à-vis des 03 champignons phytopathogènes.

**Tableau 17.** Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries vis-à-vis des Souches testées par la méthode de stries croisées.

Microorganismes cibles	Diamètre de zone d'inhibition (mm)			
Bactéries Gram-positif	C	MS1	10	D2
1. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	16	08	05	13
2. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 533	20	24	19	03
3. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	13	11	09	05
4. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 44300	17	12	13	32
5. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	22	26	10	36
6. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 1222	16	09	17	11
Bactéries Gram-négatif				
7. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11	11	23	00
8. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816	24	16	22	00
9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 82827	15	21	29	00
10. <i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	05	17	12	00
Levures				
11. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	07	13	12	00
12. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	10	08	16	00
Champignons filamenteux				
13. <i>Fusarium culmorum</i>	24	27	19	00
14. <i>Verticillium dahliae</i>	30	19	26	00
15. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	33	33	35	00

Les trois (03) isolats d'actinobactéries (MS1, 10 et C) montrent une importante action antibactérienne, antilevuriennes et antifongique vis-à-vis des micro-organismes testés. Cette activité est plus moins hétérogène. L'actinobactéries D2 montre une forte action antibiotique vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* ATCC 44300 et ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 avec des zones d'inhibition de 32, 36 et 13 mm respectivement alors que le reste des souches testées se révèlent peu ou pas sensibles à l'antibiotique sécrété par D2. Cet isolat présente un spectre d'action très étroit.

Nous avons constaté que les 03 isolats (C, MS1 et 10) ont montré une activité antifongique vis-à-vis des 03 champignons phytopathogènes. Cette activité est assez répondue chez les actinobactéries (**Dhanasekaran, 2008**). D'ailleurs, l'activité antifongique des actinobactéries a été déjà montré contre plusieurs champignons phytopathogènes tel que : *Verticillium dahliae* (**Entry et al., 2000 ; Harir et al., 2017**), *Phytophthora* sp. (**Xiao et al., 2002**) et *Fusarium oxysporum* (**Getha et Vikineswary, 2002**).

Selon **Jinhua et al., 2010**, le genre d'actinobactérie, *Streptomyces Malayasiensis* MJM1968 produit de l'Azalomycin, composé antifongique pouvant réduire efficacement l'effet inhibiteur des champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia*-

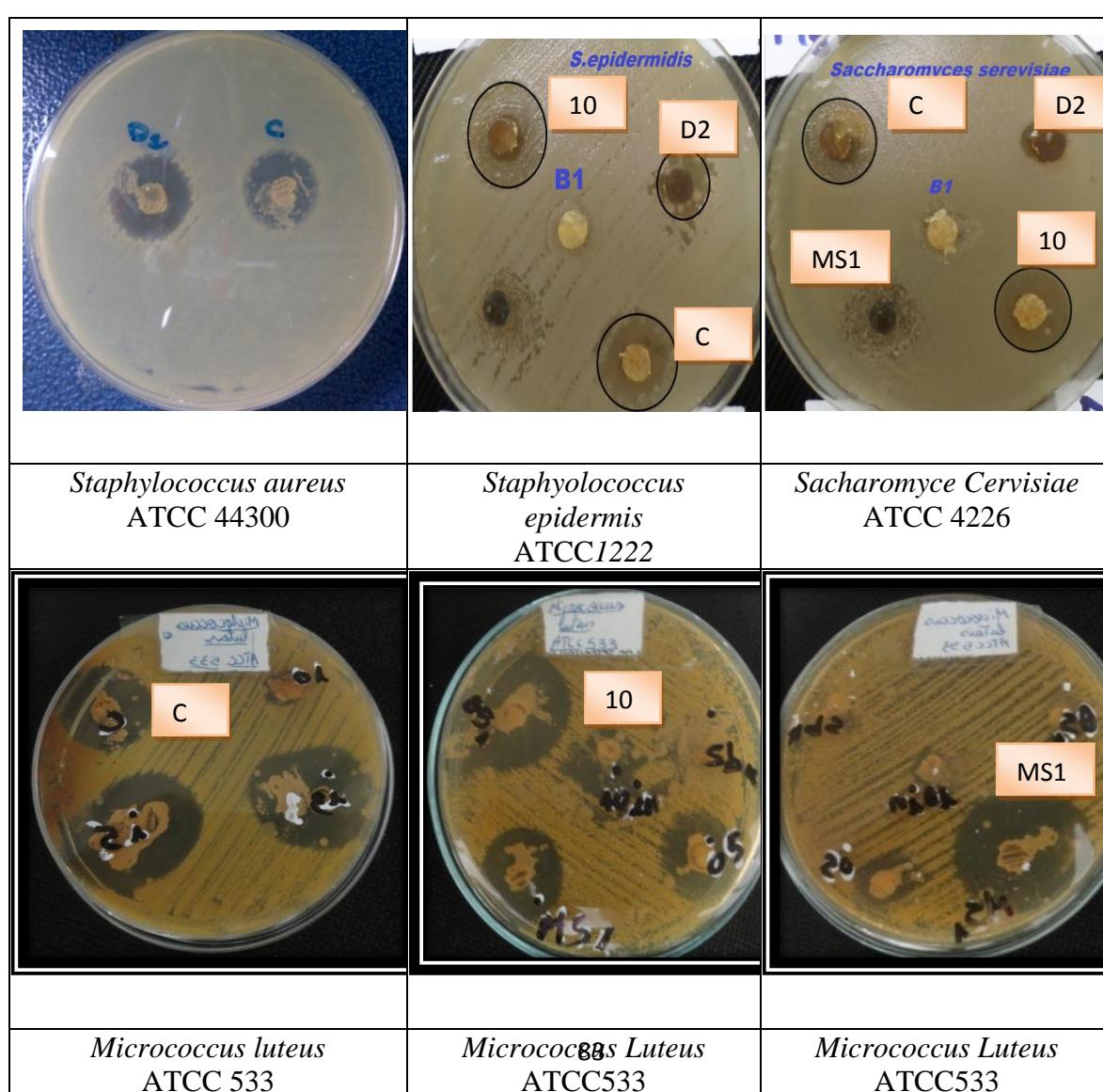
*Solani* et *Alternarioa mali*. Cette activité antibiotique serait liée probablement à la sécrétion des substances antifongiques (Badji et al., 2005), ou bien à l'action mycolytique des isolats d'actinobactéries par la sécrétion d'enzymes lytiques représentées par les chitinases, qui dégradent la chitine présente sur la paroi des champignons (Mane et Deshmukh 2009).

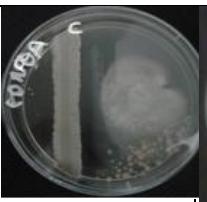
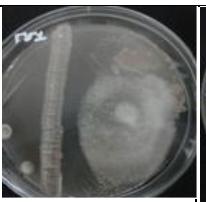
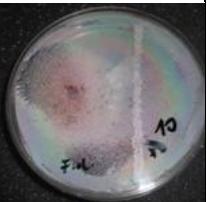
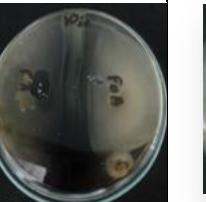
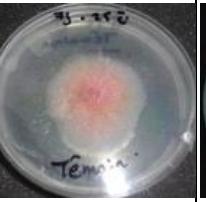
Il est à signalé que certains champignons possèdent la capacité de synthétiser des enzymes, qui inactivent l'antibiotique de l'actinobactérie en modifiant sa structure chimique (Asselineau et Zalta, 1973).

## 2.2 Technique de cylindre d'agar

Afin de comparer et de confirmer l'activité antimicrobienne de nos isolats, nous avons utilisé une autre technique plus précise, celle de cylindre d'agar (Figure 35). Les tests de l'activité antifongique *in vitro* des quatre actinobactéries, sont effectués selon la méthode décrite par (Min et al., 2010). Elle consiste à calculer le pourcentage d'inhibition de la croissance (Figure 36).

**Figure 35:** Résultats de l'activité antibactérienne des 04 isolats d'actinobactéries (10, MS1, C et D2) vis-à-vis des microorganismes bactériens (Technique de cylindre d'Agar).



Les champignons Phytopathogènes					
L'isolat C			L'isolat MS1		
					
<i>Fusarium. colmorum.</i>	<i>Fusarium. oxysporum Albedinis</i>	<i>Verticillium. dahliae</i>	<i>Fusarium. colmorum.</i>	<i>Fusarium. oxysporum albedinis</i>	<i>Verticillium. dahliae</i>
L'isolat 10			Colonies témoins		
					
<i>Fusarium. colmorum.</i>	<i>Fusarium. oxysporum Albedinis</i>	<i>Verticillium. dahliae</i>	<i>Verticillium. dahliae</i>	Témoin <i>Verticillium. dahliae</i>	<i>Fusarium. oxysporum albedinis</i>

**Figure 36.** Résultats de l'activité antifongique des 03 isolats d'actinobactéries (**10, MS1 et C**) vis-à-vis des champignons phytopathogènes (*Verticillium dahliae*, *Fusarium Colmorum* et *Fusarium oxysporum albedinis*).

**Tableau 18.** Diamètres d'inhibition de la croissance des souches de référence par les isolats d'actinobactéries (**D2, MS1, C et 10**) - technique de cylindre d'Agar.

Microorganismes cibles	Diamètres d' inhibition (mm)			
bactéries Gram-positif	C	MS1	10	D2
1. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	21	14	15	11
2. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 533	28	35	22	08
3. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	20	20	13	04
4. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 44300	20	19	21	33
5. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21	22	20	26
6. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 1222	22	18	13	11
bactéries Gram-négatif				
7. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19	19	22	00
8. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816	20	20	22	00
9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 82827	18	18	20	00
10. <i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	11	15	21	00
Levures				
11. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	18	20	16	00
12. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	17	20	11	00
Champignons filamentueux (% d'inhibition de la croissance)				
13. <i>Fusarium culmorum</i>	36	38	32	00
14. <i>Verticillium dahliae</i>	34	35	40	00
15. <i>Fusarium oxysporum f. sp. albedinis</i>	39	35	37	00

L'actinobactérie **D2**, sélectionnée précédemment montre une importante action antibiotique vis-à-vis des souches de *S. aureus* ATCC 43000 et ATCC 25923 (**Tableau 18**), la plus forte action observée induit une zone (auréole) d'inhibition de 33 mm de diamètre. Ces résultats suggèrent que l'actinobactérie D2 possède un pouvoir antibiotique vis-à-vis des bactéries à coloration Gram positif. Ces résultats confirment également les valeurs obtenues par la technique de stries croisées. L'inhibition obtenue pour le reste des souches varie entre 8 et 11mm. Les bactéries Gram négatif et les champignons se sont montrées indifférentes (insensibles) aux sécrétions de l'actinobactérie D2.

L'activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram positif pourrait être expliquée par la composition chimique de la membrane des Gram positif par le peptidoglycane et absence de couche lipopolysaccharide (**LPS**) qui est présente chez les bactéries à Gram négatif. Cette couche rend la membrane cellulaire imperméable aux substances lipophiles (**Kim et al. , 1994**). Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui évoquent la sensibilité des bactéries à Gram positif aux sécrétions d'actinobactérie par rapport aux bactéries à Gram négatif (**Sabaou et al., 1998; Prescott et al., 2002**).

Cette hypothèse peut nous orienter et nous renseigner sur la nature de ces substances antimicrobiennes.

L'absence d'activité antibactérienne chez certains isolats d'actinobactéries vis-à-vis des germes testés pourrait être due au développement d'une résistance contre ces substances antimicrobiennes. En effet, la résistance bactérienne vis-à-vis des antibiotiques d'actinobactérie peut être attribuée à l'inactivation enzymatique de ces antibiotiques ou, à la diminution de la perméabilité membranaire des bactéries (**Lobel et al., 2007**).

En revanche, le pouvoir antibiotique des trois isolats d'actinobactéries (MS1, C et 10) s'étend à toutes les souches bactériennes et fongiques testés. Cette action est d'intensité variable selon les souches cibles. Ces résultats confirment ceux de la technique des stries croisées. Nous pouvons conclure que ces 03 isolats d'actinobactéries ont un large spectre d'action ce qui rend l'optimisation de la production et de la purification de ces métabolites antimicrobiennes souvent difficile (Différentes substance antimicrobiennes vis à vis de chaque type de bactéries).

## **Discussion**

Nous avons essayé par les deux techniques précédemment citées de mettre en évidence l'activité antibiotique des actinobactéries vis-à-vis des microorganismes cibles. Il ressort des deux techniques que :

La technique des stries croisées donne uniquement une idée générale des potentialités des isolats d'actinobactéries, leurs résultats sont souvent difficiles à interpréter et considérés comme éléments préliminaires. En revanche, les activités antimicrobiennes des isolats sont mieux exprimées par la méthode des cylindres d'agar. Elles sont d'avantage ciblées et permettent d'apprécier plus précisément le pouvoir antibiotique des isolats d'actinobactéries. Cette technique permet aussi une meilleure visualisation et une bonne observation des zones d'inhibition, compte tenu du fait que, c'est une méthode où l'inoculum des germes cibles utilisé est précis 0.5 macFarlan. Le pouvoir antibiotique des actinobactéries vis-à-vis des microorganismes pathogènes pourrait s'expliquer au moins en partie, par une action des substances bioactives. D'ailleurs, les actinobactéries sont réputées pour leurs capacités mycolytiques et surtout antibiotiques (**Sabaou, 1998 ; Toumatia et al. ,2014**).

On pourrait donc supposer que la technique des striés croisées est une technique préliminaire pour l'étude de l'activité antimicrobienne surtout lorsqu' il s'agit d'une importante collection de souches à tester. Cette technique devrait être compléter par d'autres techniques telles que la technique des cylindres d'agar, les tests de filtrat de culture, ....

Les deux techniques expérimentées sont considérées comme des cultures mixtes (présence des germes cibles et de l'actinobactérie). Or, la présence de ces deux protagonistes dans un même écosystème stimule la production des métabolites secondaires (substances bioactives) souvent considérés comme moyen de défense chimique chez certaines souches d'actinobactéries. Les mécanismes qui régissent les interactions entre les deux protagonistes sont complexes (**Marmann et al., 2014**). Alors, différents scénarios sont envisageables. Les interactions physiques entre cellule-cellule et la production de petites molécules (molécules de détection autorégulatrice / détection du quorum, sidérophores...). Une production d'enzymes qui activent le précurseur de métabolites produits par la souche productrice qui rend le métabolite actif ou bien le transfert horizontal de gènes peut affecter l'activation ou la répression des métabolites. Ce dernier phénomène se produit sur les échelles de temps évolutives et tous les changements sont fixés en permanence sur le génome du destinataire. En dehors de ces mécanismes, la souche inductrice pourrait également induire des modifications épigénétiques sur la souche productrice (acétylation des protéines histones). La stratégie de Co-culture simule donc partiellement un scénario écologique en temps réel dans lequel les microbes interagissent dans un espace tridimensionnel (**Usama Ramdan et al., 2015**). Il a été signalé par **Moody, 2014** que la culture combinée d'une *Steptomyces endus* S-522 avec *Tsukamurella pulmonis* avait entraîné une production d'un nouvel antibiotique, alchivemycine A (6), ayant une importante activité antibiotique vis-à-vis de *Micrococcus luteus*. En conclusion à cette première partie, nous pouvons dire que ce travail avait pour but de sélectionner la ou les isolats d'actinobactéries ayant une activité importante afin de les expérimenter pour une production d'antibiotique.

## **PARTIE II : Production, purification et identification de l'antibiotique Secréte par l'isolat D2**

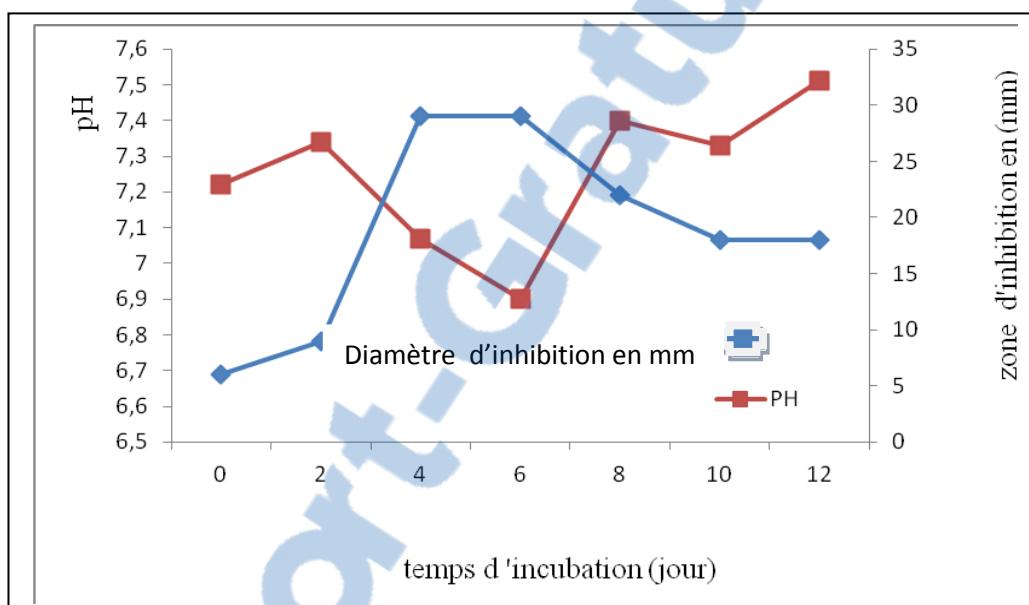
Parmi les quatre isolats d'actibactéries sélectionnés, l'isolat D2 nous a particulièrement intéressés pour la force de son action antibiotique, sa croissance relativement rapide et la couleur grisâtre de ces colonies la rendant très facile à différencier et enfin sa forte activité antibiotique vis-à-vis des espèces de *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie (*S.aureus*) est très dangereuse et provoque des infections nosocomiales dans les milieux hospitaliers. L'isolat d'actinobactérie provient du sol de Djelfa.

## II. 1. Production d'antibiotiques en milieux liquides

Cette expérience est réalisée dans deux milieux de culture de nature différente (le milieu ISP2 et le milieu Bennett), dans le but de déterminer le milieu le plus favorable à la production d'antibiotique et le temps d'incubation nécessaire à cette production. Cette étude est complétée par des tests d'activités en utilisant trois bactéries indicatrices :

- ❖ Les trois 03 germes sont des bactéries à Gram positif : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Streptococcus pneumoniae* ATCC 46619.

Au cours de l'incubation, la production d'antibiotique ainsi que le changement du pH pour l'isolat D2 ont été déterminés quotidiennement pendant 12 jours d'incubation (**Figure 37**). Les tests d'activités ont été effectués par la méthode des puits.



**Figure 37.** Cinétiques de l'évolution du pH et de l'activité antibactérienne de l'isolat D2 sur milieu liquide ISP2 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

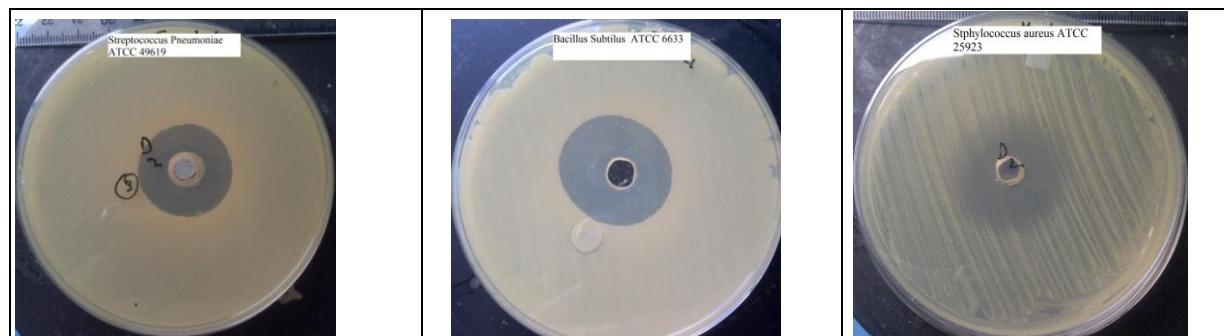
Le diamètre du puits (10 mm) est compris dans la mesure des activités.

L'évolution du pH connaît d'abord une légère basification, puis une acidification et enfin une remontée progressive. La première basification du milieu pourrait s'expliquer par le fait que dans un premier temps, l'actinobactérie utilise les composés azotés (acides aminés) comme source de carbone et d'azote avec une faible consommation du glucose comme source d'énergie, et ce n'est qu'après une période d'incubation assez importante que l'actinobactérie acidifie le milieu en utilisant le glucose comme source de carbone et d'énergie. Ce phénomène a déjà été signalé chez des nombreuses actinobactéries, notamment chez *Saccharothrix algeriensis*, chez laquelle une croissance diauxique a également été observée (**Strub, 2008**).

La production d'antibiotiques débute généralement au début de la phase stationnaire et les maxima de production sont notés durant la phase de déclin. Ceci correspond bien à des métabolites secondaires. En général, la production des métabolites secondaires par les microorganismes se commence au cours des phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinobactéries, cette production peut avoir lieu durant les phases exponentielle, stationnaire et de déclin (**Zitouni, 2005 ; Badji, 2006**). Durant les phases de déclin, les cellules se lysent et libèrent des quantités d'antibiotiques non encore sécrétés.

La courbe d'activité microbienne de l'isolat D2 est plus ou moins régulière et présente une importante activité à partir du 4<sup>ème</sup> jour d'incubation, suivi d'une phase de déclin correspondant au cinquième jour de fermentation, ce qui laisse supposer une production importante de composés bioactifs à ce stade d'étude. L'activité antimicrobienne de l'extrait de filtrat de l'isolat D2 est plus ou moins importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 multi résistante par rapport aux deux autres bactéries testées (**Figure 38**). Cette activité est traduite par la diffusion des substances douées d'une activité antimicrobienne.

Le milieu Bennett n'a pas donné satisfaction, pour cette raison les résultats ont été abandonnés.



<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 46619	<i>Bacillus Subtilis</i> ATCC 6633	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<b>Figure 38.</b> Mise en évidence de l'activité antibiotique de l'isolat D2 par la méthode des puits après 05 jours d'incubation sur milieu ISP2 (test de filtrat de culture).		

## 2. Production, extraction et semi purification des antibiotiques

L'activité antibiotique des bactéries du sol peut être expliquée par la capacité de ces micro-organismes à produire des substances diffusibles dans le milieu naturel ou artificiel.

En raison de son importante activité antimicrobienne, les travaux se sont poursuivis uniquement sur cet isolat bactérien (D2).

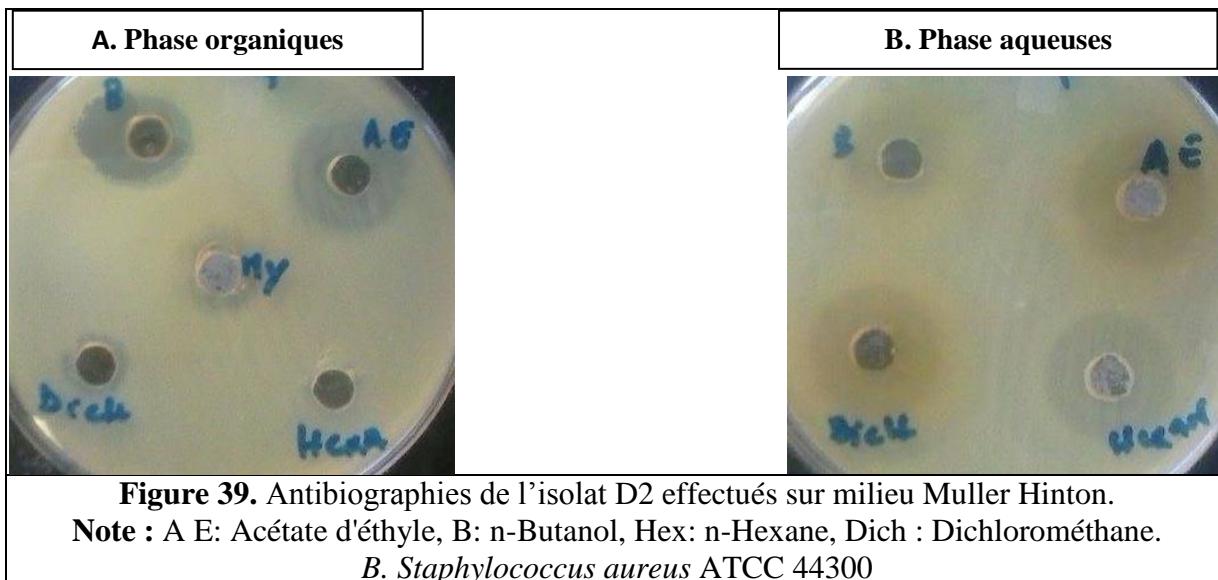
## 2. 1. Production et extraction de l'antibiotique à partir des filtrats de culture

La production de l'antibiotique de l'isolat D2 est effectuée sur milieu ISP2 liquide qui s'avère le milieu le plus favorable pour la production de cette molécule antimicrobienne. L'extraction des antibiotiques est effectuée avec 04 solvants organiques de polarité différente (n-hexane, dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol) dans l'ampoule à décanter après 05 jours de fermentation (production optimale d'antibiotiques). Les phases organiques et les phases aqueuses sont testées pour leur activité vis-à-vis d'un germe test (*S. aureus* ATCC 44300) par la méthode des puits afin de sélectionner le meilleur solvant d'extraction.

Les résultats de l'antibiographie sont présentés dans le **Tableau 19** et illustrés dans la **Figure 39**. A travers ces résultats, l'extrait brut issu par l'extraction d'éthyle acétate montre une meilleure activité antimicrobienne par rapport aux autres solvants organiques testés. Cette activité est traduite par un diamètre d'inhibition avoisinant 20 mm en revanche, les activités des extraits obtenus par le reste des solvants se sont révélées moins importante et parfois négligeables (**Figure 39 et Tableau 19**). L'éthyle acétate est connu pour son pouvoir élevé d'extraction car il permet d'extraire de façon efficace une grande quantité d'antibiotiques. Ainsi, l'éthyle acétate est retenu pour les extractions ultérieures (**Aouiche et al., 2015**).

**Tableau 19.** Zones d'inhibition (mm) des différentes phases organiques et aqueuses issues de l'extraction en utilisant les 04 solvants organiques, obtenues par la méthode des puits.

<b>Extrait brut (D2)</b>	<b>Zones d'inhibition (mm)- Phase organique</b>				<b>Zones d'inhibition (mm) -Phase aqueuse</b>				
	<b>Solvants organiques</b>	Butanol	Acetate d'éthyle	Dichloromethane	Hexane	Butanol	Acetate d'éthyle	Dichlomethane	Hexane
<i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 25923		18	20	11	07	10	13	14	14
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC14990		12	16	12	08	15	10	16	13



## 2. 2. Mise en culture de l'isolat D2, extraction des antibiotiques et antibiographie

Après la mise en culture sous agitation continue (220 rpm) de l'isolat sur milieu liquide ISP2 pendant cinq jours à 30 °C, le filtrat de culture est récupéré par centrifugation après élimination de la biomasse. Une extraction a été ensuite effectuée par l'acétate d'éthyle qui s'est avéré le meilleur solvant. La phase organique obtenue est filtrée puis évaporée. L'extrait brut est récupéré, pesé ensuite dissout dans du méthanol afin d'évaluer la concentration de la molécule antimicrobienne par des tests d'activité en se basant sur la méthode des trous et des disques de papier Wattman (15 µl par disque 06 mm) vis-à-vis de certaines bactéries indicatrices (**Annexe III**).

Il est à signaler que plusieurs lots d'extrait brut issus de l'isolat D2 ont été testés et que les extractions ont été effectuées à des périodes différentes, et les extraits obtenus ont été conservés dans le réfrigérateur à 4 °C. Ces essais sont effectués dans le but de tester et d'évaluer la stabilité de la molécule antimicrobienne avant son injection à l'HPLC. Les résultats obtenus sont rapportés dans les **Tableaux 20 et 21**.

**Tableau 20 :** Révélation des activités antibiotiques des extraits organiques (différents lots) de l'isolat D2 par antibiographie. 25 µl/ puits ou bien 15 µl/disque vis-à-vis des bactéries pathogènes.

Souches	Espèces bactériennes	Caractéristiques	Zone d'inhibition (Ø mm)				
			Méthanol	Gram	D2 lot 4	D2 lot 1	CM 30 µg
044R	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TiGE KpC+	6	GR-	6	6	30
MR 157	<i>Acinetobacter Baumannii</i>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup> (OXA /OXA- 58)	6	GR-	6	6	6
ATCC 25922	<i>E.Coli</i>	Souche de référence, type sauvage	6	GR-	6	6	27
VR-143 /97	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FQ <sup>r</sup> AG <sup>r</sup> ESC <sup>r</sup> NEM <sup>r</sup> (MBL /VIM-1).	6	GR-	6	6	6
ATCC 29212	<i>Enterococcus Faecalis</i>	VAN <sup>r</sup>	7	GR+	6	6	6
ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	Souche de référence, type sauvage	7	GR+	21	22	33
USA 300	<i>S. aureus</i>	clone Epidemique, ST8, MR (sccMEC IV)	7	GR+	31	24	28
3851	<i>S. aureus</i>	isolat Clinique, MR, VISA	7	GR+	22	22	32
Mu50	<i>S. aureus</i>	isolat Clinique, VISA	8	GR+	28	26	30
Mu3	<i>S. aureus</i>	isolat Clinique, hVISA	6	GR+	22	22	32
USA 400	<i>S. aureus</i>	Epidemique clone, ST1, MR (sccMEC IV)	8	GR+	22	21	32
WIS	<i>S. aureus</i>	isolat Clinique, MR (sccMEC V)	7	GR+	15	16	33
Si-BRC	<i>S. aureus</i>	isolat Clinique, DAP <sup>r</sup>	6	GR+	28	26	33
Ar-RJ	<i>S. aureus</i>	isolat Clinique, MR (PVL)	6	GR+	21	21	31
FI-4	<i>S. epidermidis</i>	isolat Clinique, LNZ <sup>r</sup> (CFR)	6	GR+	6	6	6
MR148	<i>E. faecalis</i>	isolat Clinique, VAN <sup>r</sup>	6	GR+	6	6	30
MZN	<i>E. faecium</i>	isolat Clinique, VAN <sup>r</sup> , TEICO <sup>r</sup>	6	GR+	6	6	32
ATCC 6633	<i>B. subtilis</i>	Souche de référence, type sauvage	8	GR+	18	17	33
ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i>	Souche de référence, type sauvage	9	GR+	31	30	37

NEM<sup>r</sup>: résistance au Carbapenems (imipenem et /ou meropenem); ESBL: B-lactamase à spectre élargis ; MBL: metallo-B-lactamase. MR : résistance à la Methicilin FQ<sup>r</sup>: résistante à la fluoroquinolones; AG<sup>r</sup>: résistante à la aminoglycosides (gentamicine, amikacine, et/ou tobramycine); ESC<sup>r</sup>: résistant à un large spectre céphalosporines; NEM<sup>r</sup>:résistance à la carbapenemes (imipeneme et/ou meropeneme); COL<sup>r</sup>:résistance au colistine; MR résistante

methicilline; VISA: -intermediaire à la vancomycine; hVISA: hétérogène et intermédiaire au vancomycine; VAN<sup>r</sup>: résistante à la vancomycine; TEICO<sup>r</sup>: résistante au teicoplanine; LNZ<sup>r</sup>: résistante au linezolide.

**Tableau 21.** Révélation des activités antibiotiques des extraits organiques de l'isolat D2 par antibiographie. 25 µl/ puits ou bien 15 µl/disque.

Caractéristiques	Différent lots de l'extrait brut D2		
Souche de référence, type sauvage	Zone d' inhibition (Ø mm) (methanol: 7 mm)		
	D2 lot 2	D2 lot 3	D2 lot 7
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	31	17	30

Intervalle d'inhibition du chloramphénicol pour *S. aureus* : 19-26 mm, et pour *S. pneumoniae*: 23-27 mm.

Dans l'ensemble, les résultats sont très intéressants et confirment notre observation précédente. Les extraits de l'isolat D2 à l'acétate d'éthyle ont un pouvoir antimicrobien sur toutes les bactéries à coloration Gram positif à l'exception d'*E. faecalis* et *E. faecium* qui se sont montrées résistantes. De même, nous avons constaté que l'ensemble des bactéries à coloration Gram négatif sont résistantes. L'extrait testé semble être à la fois actif contre les souches de *S. aureus*, ainsi que des souches MDR (multi résistantes) avec différents déterminants phénotypes de la résistance et des souches représentantes de clones (**Tableau 20**).

Nous avons constaté que l'extrait n'était pas actif contre la souche *Staphylococcus epidermidis* FI-4 testée. Cette souche semble porter un déterminant de la résistance (gène cfr) qui affecte la susceptibilité aux phénicols, aux lincosamides, aux oxazolidinones, aux pleuromutilines et aux composés streptograminés A. Ce résultat peut nous renseigner sur la nature du composé actif et c'est la raison pour laquelle nous avons testé le même extrait vis-à-vis de la souche de *Staphylococcus aureus* SA- cfr Ant porteuse du (gène de cfr).

L'extrait brut de l'isolat D2 n'a montré aucune activité contre *Enterococcus*, ce résultat confirme ceux de la première expérience, par contre cet extrait a exercé une activité sur *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 et *B. subtilis* ATCC 6633 (souche indicatrice commune dans les essais d'identification d'activité antibiotique). En ce qui concerne l'étude de l'activité des différents lots de l'isolat D2 conservés pendant un mois vis-à-vis de la souche de *S. aureus* ATCC 25923 uniquement, ces derniers ont conservé la même activité à l'exception du lot 3 qui semble moins actif (**Tableau 21**).

Nous avons également testé l'extrait brut de l'isolat D2 vis-à-vis de plusieurs espèces de *Staphylococcus*. Les résultats de ce test sont rapportés dans le (**Tableau 22**).

**Tableau 22 :** Révélation des activités antibiotiques des extraits organiques de l'isolat D2 par antibiographie vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* multi résistantes.

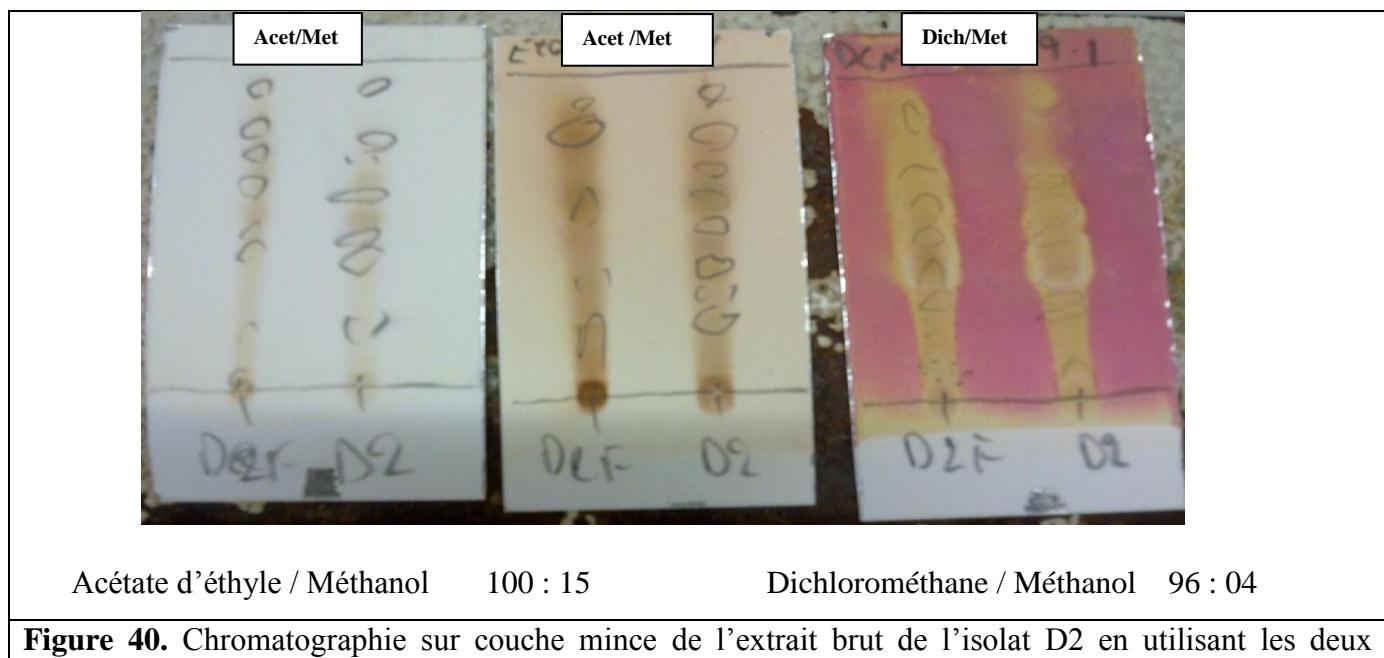
Souche	Espèces	Caractéristiques	Ø Zone d'inhibition (mm)		
			méthanol	D2 lot 4 (21/6/16)	CM 30 µg
SA-CFR_Anto	<i>S. aureus</i>	isolat Clinique, LNZ <sup>r</sup> (CFR)	7	24	6
ATCC 14990	<i>S. epidermidis</i>	Souche de référence, type sauvage	7	12	38
Pz240/M	<i>S. warneri</i>	isolat Clinique, MR	7	<b>34</b>	36
Pz6097/1	<i>S. hominis</i>	isolat Clinique, MR	7	12	34
MR1002	<i>S. haemolyticus</i>	isolat Clinique	8	<b>28</b>	35

Nous avons remarqué d'une part, que l'extrait de D2 (lot 4) a une activité contre *S. aureus* porteuse de gène cfr et d'autre part, une faible activité sur la souche de référence *S. epidermidis* ATCC 14990. Cela pourrait suggérer que le gène cfr seul ne peut pas être responsable du phénotype de résistance que nous avons observé avec la souche *S. epidermidis* cfr+, mais cela peut-être due à d'autres facteurs liés aux espèces bactériennes.

En effet, l'activité vis-à-vis de *S. epidermidis* semble généralement inférieure à celle de *S. aureus*. L'extrait de la D2 est également actif contre d'autres espèces de *Staphylococcus*, entre autre *S. warneri* et *S. haemolyticus* mais avec une activité plus faible contre *S. hominis* (**Tableau 22**). Toutes ces observations méritent d'être confirmées en testant les lots actifs aussi bien la fraction active uniquement contre les mêmes pathogènes pour pouvoir interpréter nos résultats.

### 2. 3. Détection des antibiotiques par bio autographie

Nous avons effectué une chromatographie sur couche mince avec l'extrait brut issu de l'extraction par l'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue des filtrats de culture sur milieu ISP2 est analysée. Le système de solvant de migration utilisé est l'acétate d'éthyle-méthanol (100 :15, v/v) (**Figure 40**).



**Figure 40.** Chromatographie sur couche mince de l'extrait brut de l'isolat D2 en utilisant les deux systèmes de solvants (Méthanol / Acétate d'Ethyle) et (Dicholorométhane / Méthanol).

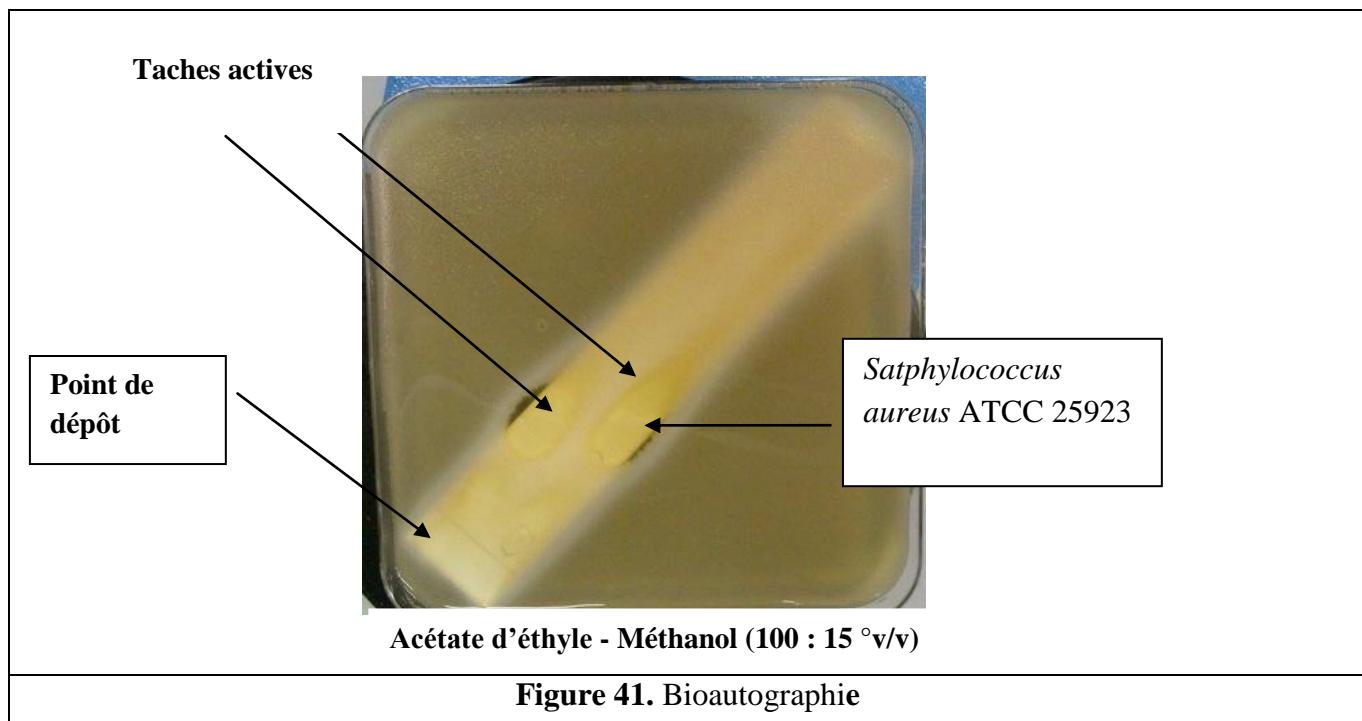
## 2. 4. Autobiographie de l'extrait brut de l'isolat D2

L'extrait à l'acétate d'éthyle contient 08 spots et probablement plus, avec différents facteurs de rétention ( $R_f$ 1 à  $R_f$  8) dont, deux taches sont actives et se disposent tout au début de la séparation de l'extrait brut ( $R_f$ 1 = 0.20 et  $R_f$ 2 = 0.30) après une révélation microbiologique par une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 44300 (**Figure 41**).

On peut estimer que cet extrait brut peut contenir plus que 08 composés car il peut y avoir des spots qui se superposent les uns sur les autres, ce qui rend leur séparation et leur purification plus complexe sur une simple colonne de chromatographie.

**Tableau 23 :** Chromatographie de l'extrait brut de l'isolat D2 par CCM.

Eluants	
Acétate d'éthyle - Méthanol (100 :15, v/v)	Dichlorométhane - Méthanol (96 : 4, v/v)
$R_f$ 1 $R_f$ 2 $R_f$ 3 $R_f$ 4 $R_f$ 5 $R_f$ 6 $R_f$ 7 $R_f$ 8	$R_f$ 1 $R_f$ 2 $R_f$ 3 $R_f$ 4 $R_f$ 5 $R_f$ 6 $R_f$ 7 $R_f$ 8
0,20 0,30 0,36 0,51 0,57 0,66 0,78 0,90	0,09 0,21 0,30 0,39 0,51 0,60 0,69 0,87

**Figure 41.** Bioautographie

**Figure 41.** Localisation par bioautographie des zones actives de l'extrait organique des filtrats de culture de l'isolat D2 contre *Satphylococcus aureus* ATCC 25923. AM : Système de migration «Acétate d'éthyle-Méthanol » (100-15 v/v).

## Discussion

Afin de détecter les fractions actives contre les bactéries sensibles vis-à-vis de l'extrait brut, 02 systèmes de solvants de migration ont été utilisés pour l'extrait organique de la D2. La meilleure séparation a été obtenue par les éluants : AM (Acétate d'éthyle-Méthanol, 100:15, v/v) par rapport au Dichlorométhane – Méthanol, 96 :04, v/v).

Une seule tache active a été détectée parmi les 08 taches qui ont été dénombrées et localisées par bioautographie grâce à leur RF et à leur couleur sous lumière ultraviolette. Il est à signaler que lors de la séparation des taches actives de l'extrait brut de l'isolat D2 nous avons rencontré quelques difficultés, quel que soit le système de solvant de migration utilisé, en raison de la formation des taches superposées sur plaque CCM. Cette contrainte d'ordre technique nous a conduits à utiliser la méthode de l'HPLC.

Le fait d'avoir des zones actives superposées (difficilement séparables) après avoir tester les deux systèmes de solvants de migration signifie que ces complexes antibiotiques sont composés de molécules appartenant à une même famille chimique et ne diffèrent que par un petit groupement chimique. Dans ce genre de situation, il est souhaitable de diversifier les méthodes de séparation.

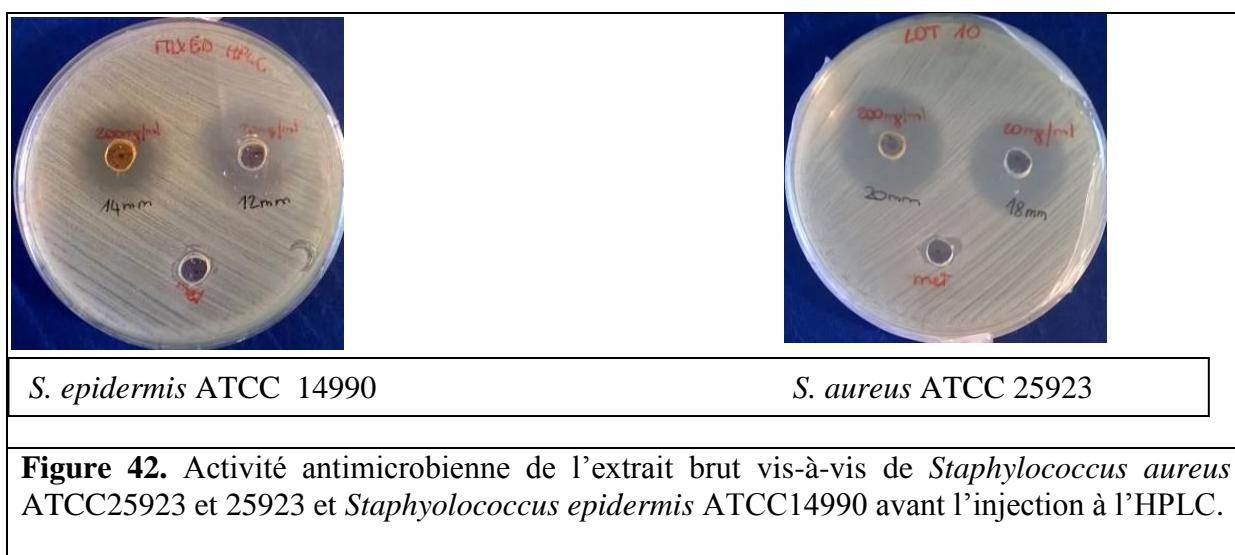
Des méthodes telles que la chromatographie sur gel de séphadex, la chromatographie d'adsorption ou la chromatographie d'échange ionique pourraient améliorer la séparation de ces composés. Des antibiotiques tels que la pénicilline, la céphalosporine ou la streptomycine sont obtenus par ces méthodes respectivement (**Larpent et Sanglier, 1989**). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Aouiche et al., 2013; Toumatia et al., 2014**.

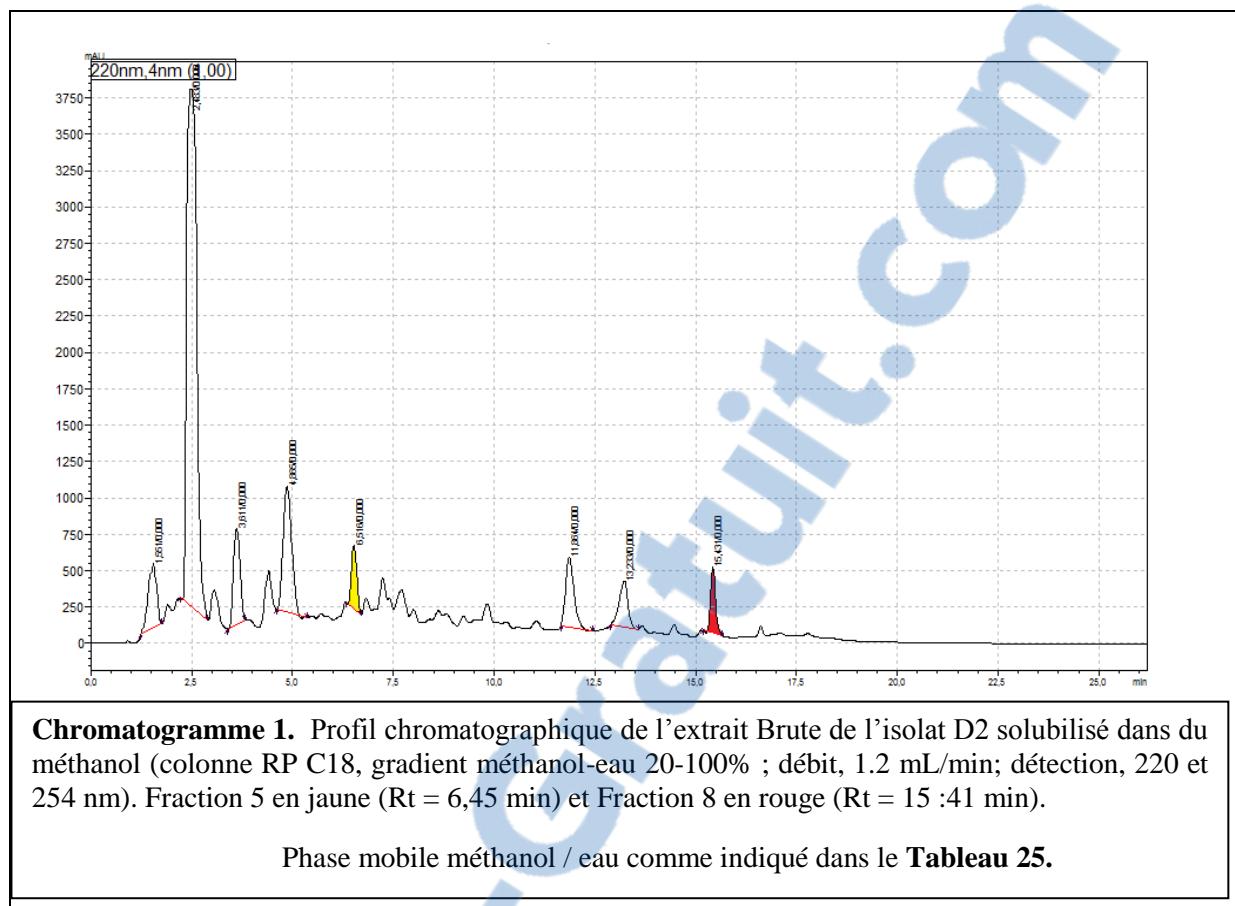
## 2. 5. Analyse et purification des antibiotiques par HPLC semi préparative

### 2. 5.1. Analyse par la technique d'HPLC semi préparative

L'extrait brut de l'isolat D2 issu par extraction à l'acétate d'éthyle provenant de 03 litres du filtrat de culture sur milieu ISP2 a été concentré à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C, puis repris dans 01mL de méthanol. Il a été ensuite semi purifié sur plaques de chromatographie de couche mince (CCM). Après développement de la plaque sur le système de solvants de migration, acétate d'éthyle-méthanol, nous avons pu détecter les composants actifs correspondant aux spots dont les facteurs de rétentions sont : 0,20 et 0,30 respectivement. Ces spots ne sont pas totalement séparés. Afin de séparer ces deux composés bioactifs, deux concentrations d'extrait brut ont été testées, l'une est de 20 mg/mL, l'autre de 200 mg/l vis-à-vis d'une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pour confirmer son activité antimicrobienne (**Figure 42**). Une quantité de 10 à 20 µl d'extrait brut filtré est injecté dans l'HPLC semi-préparative en phase inverse sur colonne C18.

La détection a été faite à 220, 230 et 254 nm à un débit de 1,2 mL/min pendant 25 min. Le chromatogramme 1 illustre le profil chromatographique de l'extrait semi-pur de l'isolat D2.



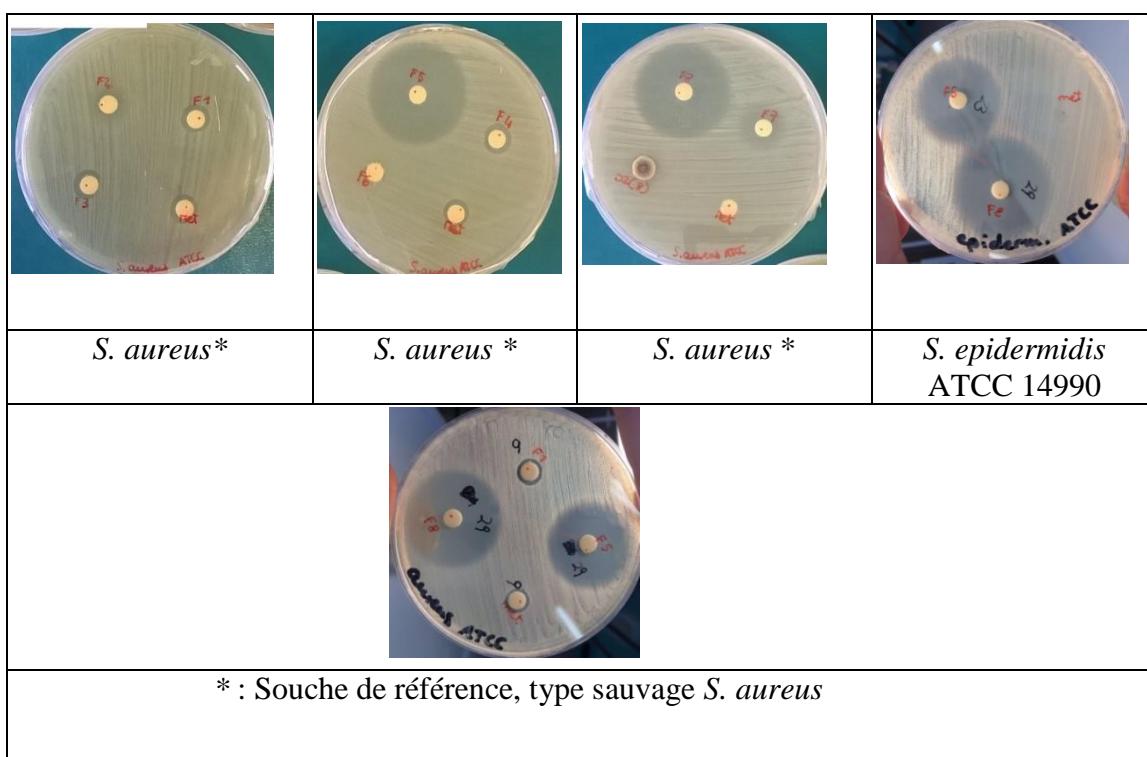


Les fractions sont matérialisées sur le chromatogramme par de nombreux pics. Ainsi, 08 fractions majoritaires ont été choisies et expérimentées en fonction de leur temps de rétention. Ces fractions sont récupérées séparément, évaporées à sec, dissoutes chacune dans 150 µl de méthanol ensuite testées par antibiographie contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 à raison de 15µl par disque. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **Tableau 24 et Figure 43**.

**Tableau 24.** Résultats de l'activité des fractions majoritaires vis-à-vis de la souche *S. aureus* de référence de type sauvage.

		<i>S. aureus</i> *
Les Fractions		<i>S. aureus</i> (souche de référence, type sauvage) (Diamètre en mm)
Zone d'inhibition Q mm (méthanol : 7mm)	D2 Fraction 1	10
	D2 Fraction 2	8
	D2 Fraction 3	10
	D2 Fraction 4	10
	D2 Fraction 5	<b>29</b>
	D2 Fraction 6	8
	D2 Fraction 7	8
	D2 Fraction 8	<b>29</b>

Caractéristique de *S. aureus* : MR résistante à la méthicilline ; LNZ<sup>r</sup>, résistante au linezolide



**Figure 43.** Test d'activité par antibiographie des fractions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 de la souche D2 contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (15 µl par disque) testée par antibiographie.

## **Discussion**

Les premières injections en HPLC ont révélé la présence de plusieurs fractions, dont deux, F5 et F8 se sont montrées actives contre *S.aureus* et leur temps de rétention est de 06 et 15 min respectivement. Selon la littérature, les actinobactéries peuvent synthétiser plus d'une trentaine d'antibiotiques (**Trujillo et al., 1997**). L'exemple le plus édifiant est celui de *Streptomyces hygroscopicus* qui sécrète plus de 180 antibiotiques (**Demain et Fang, 1995**). Certaines molécules sont actives uniquement contre les bactéries alors que d'autres le sont que sur les champignons. En revanche, d'autres sont actives sur les deux groupes de microorganismes. Les deux molécules actives de notre isolat D2 sont récupérées à un gradient méthanol-eau moyen à polaire. La séparation des antibiotiques entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase (**Louis, 2001**).

### **2. 5.2. Purification des antibiotiques de l'isolat D2 par HPLC**

Nous avons remarqué qu'après chaque cycle de purification, les deux fractions actives F5 et F8 sont toujours présentes bien que les profils de chromatogrammes sont différents (les cultures sont réalisées à des périodes différentes). Nous avons constaté aussi que la fraction F8 est présente en faible quantité. Cette fraction peut être facilement purifiée par rapport à la fraction 5 qui est toujours présente en quantité importante, ce qui laisse sa purification très difficile. Plusieurs injections de 20 µl sont réalisées successivement afin d'obtenir une quantité suffisante de la fraction F8.

La quantité de cette fraction est récupérée, évaporée ensuite dissoute dans du méthanol puis injecter dans l'HPLC. Les résultats de cette étude exigent la nécessité de rechercher les conditions adéquates pour optimiser la purification du point de vue qualitatif et quantitatif.

### **2. 5.3. Résultats de l'optimisation des paramètres d'HPLC**

Sur la base des données préliminaires, notre travail a été porté sur la séparation et la purification des composés actifs présents dans l'extrait brut (**échantillon A**) en utilisant le même procédé d'HPLC pour identifier les huit fractions (**Tableau 21 et chromatogramme 1**).

Ces fractions ont été recueillies en fonction des temps de rétention du pic **5 (R<sub>t</sub> = 6,45 min) et du pic 8 (R<sub>t</sub> = 15,41 min)**. Les fractions ainsi recueillies sont purifiées en se focalisant sur la fraction correspondante au pic 8, renommée fraction **H**. Les essais d'optimisations des paramètres d'HPLC seront évoqués ultérieurement.



### 1) Préparation de l'échantillon A pour l'HPLC

L'extrait brut de l'échantillon A a été préparé par dissolution dans du méthanol pour l'HPLC. Après filtration, une injection de la solution obtenue à une concentration de 1 mg/mL dans un pilulier a été effectuée. Pour la séparation des composants de l'extrait brut A, nous avons utilisé les mêmes conditions précédemment citées (**Chromatogramme 1**) dont la méthode utilisée est décrite comme suit :

Description de la méthode 1

- i) phase stationnaire : Colonne analytique à phase inverse C18-RP placée en tant que
- ii) phase mobile : Méthanol et eau (pour HPLC).
- iii) Temps d'élution : gradients sont décrits dans (**Tableau 25**).

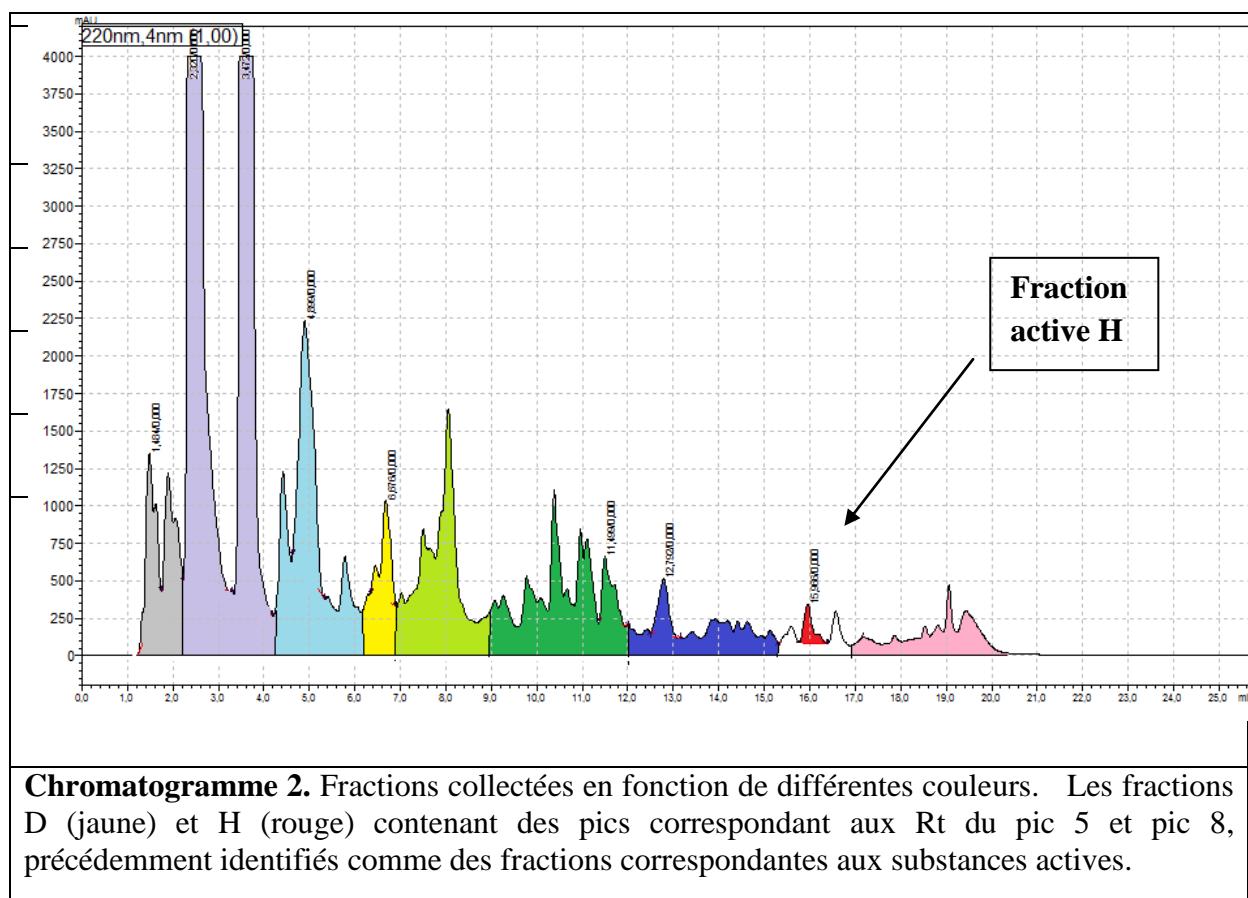
**Tableau 25.** Représente les paramètres de la méthode 1

Temps	Eluants		<b>Flux</b> (mL/min)	1.2
	<b>CH<sub>3</sub>OH</b> (%)	<b>H<sub>2</sub>O</b> (%)		
0 .01	10	90		
17	100	0	<b>T</b> (°C)	25
18	100	0	<b>VInJ</b> (μL)	20
20	10	90	<b>λ</b> (nm)	254 ; 220 ; 230
25	<b>Fin de Cycle</b>			

Pour la suite du travail, cette méthode est modifiée afin de réduire le temps requis (temps de séparation, 20 min au lieu de 25 min) afin d'accélérer la purification de l'extrait brut de l'échantillon A (de 167 mg). Cet extrait est dilué à raison de 4 mg/mL de méthanol dans des piluliers. Un volume de 20 μl a été utilisé pour l'ensemble des injections effectuées en HPLC. Les fractions obtenues sont indiquées dans le **Tableau 26** et le **Chromatogramme 2**. Ces fractions sont ensuite récupérées.

**Tableau 26.** Composition des fractions recueillies en fonction du temps d'élution.

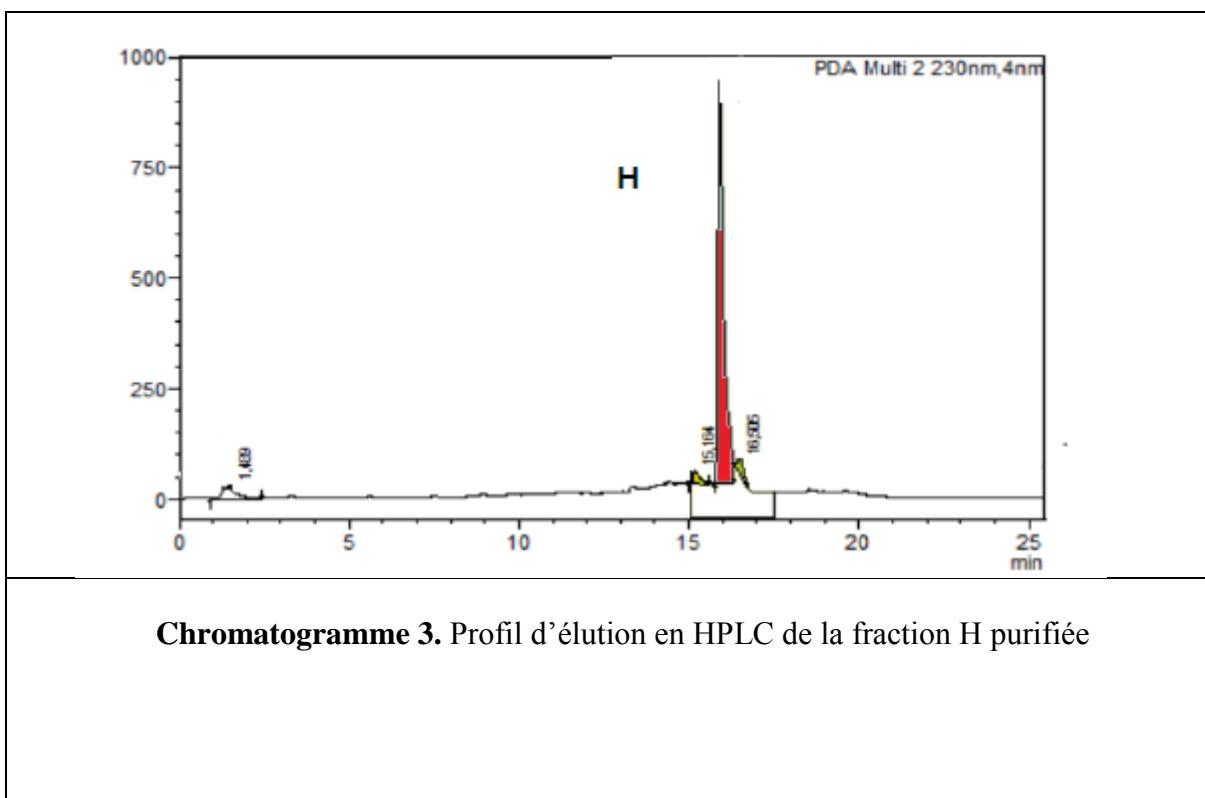
Fractions collectées	Intervalle de temps (min)	Fractions collectées	Intervalle de temps (min)
A	0,01 - 2,25	E	7,70 – 9,00
B	2,25 – 4,25	F	9,00 – 12,00
C	4,25 – 6,00	G	12,00 – 15,00
D (jaune)	6,00 – 7,70	H (rouge)	15,00 – 17,50



Les différentes fractions ont été collectées pour une analyse ultérieure à des intervalles de temps d'élution selon le **Tableau 26**. Afin de collecter la totalité de l'extrait, nous avons pris soins à isoler les fractions contenant les pics 5 et 8, précédemment identifiées comme des fractions correspondantes aux substances actives (**Chromatogramme 2**).

Pour la suite du travail, seule la fraction rouge correspondant au pic 8 a fait l'objet d'une purification. Nous avons ainsi procédé à l'isolement et la caractérisation du pic 8, correspondant à la fraction H, bien qu'elle soit représentée par un faible pourcentage par rapport à l'extrait brut, du fait qu'elle représente le dernier pic élué de la colonne et qu'elle soit facile à être purifié pour l'analyse structurale.

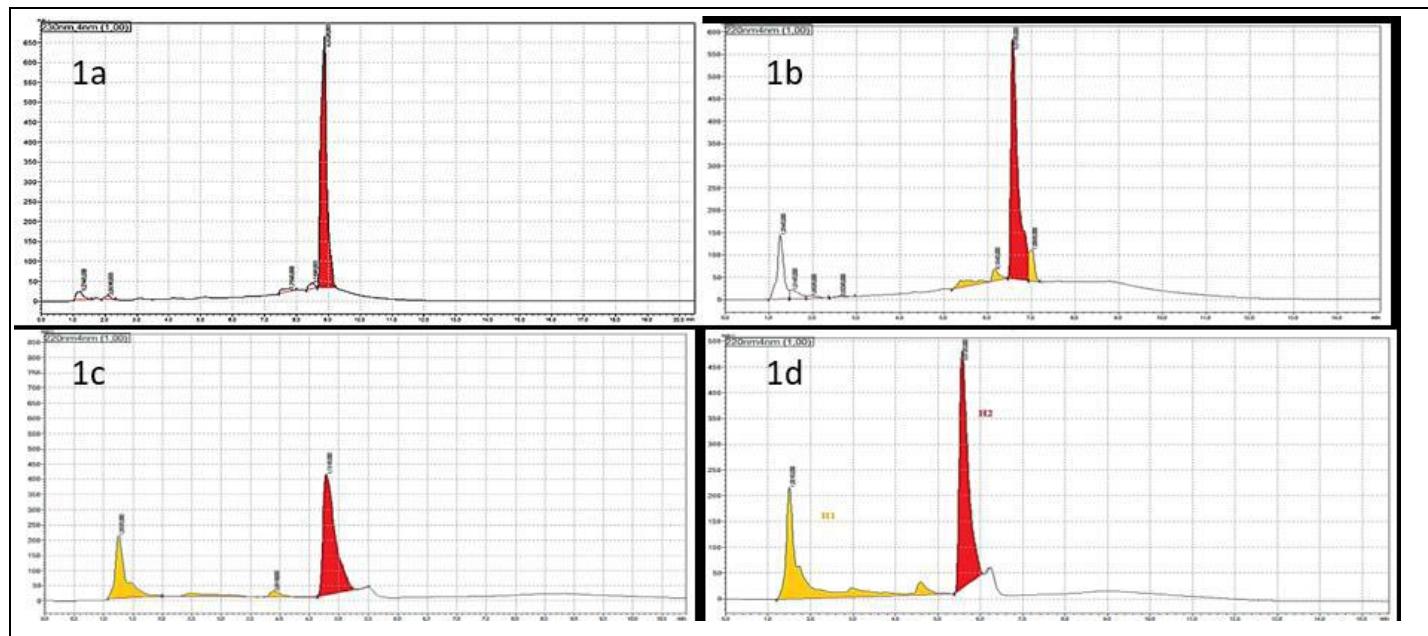
La phase de séparation et la collection des fractions mentionnées ci-dessus ont été répété jusqu'à épuisement de l'extrait entier (échantillon A). La pureté de la fraction **H** a été évaluée par HPLC, selon les mêmes conditions énoncées par la **méthode 1** initiale établie pour la première séparation (**échantillon A**). Le chromatogramme obtenu (**chromatogramme 3**) a montré que la fraction **H** avait une bonne pureté, malgré la présence de certaines traces d'impuretés, avec un **R<sub>t</sub>** de **15,16** et le pique **H**, représentatif de la fraction était superposable au **pic 8** dont le **R<sub>t</sub> = 15,90 min.**



Dans le but d'éliminer les traces d'impuretés du pic **H**, nous avons mis au point un autre procédé utilisant le même type de colonne et la même phase mobile. Le **tableau 27**, résume les différentes méthodes utilisées, avec la variation de gradient et/ou le flux d'injection pour obtenir à la fois une diminution de la durée de cycle de séparation et une réduction de temps de rétention et enfin améliorer la purification (**chromatogrammes 4 - 7**).

**Tableau 27.** Paramètre des méthodes 1a-d

Temps (mn)	CH <sub>3</sub> OH (%)	H <sub>2</sub> O (%)	Flux (mL /mn)	T (° C)	V <sub>inj</sub> (μ l)	λ (nm)
<b>Méthode 1a</b>			1.2	25	10	220 ; 230
0.01	20	80				
7	100	0				
10	20	80				
25	Fin de cycle					
<b>Méthode 1b</b>			1.2	25	10	220 ; 230
0.01	60	40				
5	100	0				
6	100	0				
10	60	40				
20	Fin de cycle					
<b>Méthode 1c</b>			1.2	25	10	220 ; 230
0.01	70	30				
5	90	10				
7	98	2				
10	70	30				
20	Fin de cycle					
<b>Méthode 1d</b>			1.0	25	10	220 ; 230
0.01	70	30				
5	90	10				
7	98	2				
10	70	30				
20	Fin de cycle					

**Chromatogrammes 4-7.** Comparaison des résultats obtenus avec les différents tests (Méthodes 1a -d)

A travers les résultats des divers essais, nous avons choisi les conditions de la méthode 1d. Cette méthode a permis une réduction du **Rt** et une purification plus ou moins améliorée du pic d'intérêt (**pic H**). En raison d'une faible quantité purifiée, nous n'avons pas pu réaliser l'analyse de la structure et la caractérisation par RMN. Cela nous a amené à réaliser une nouvelle fermentation.

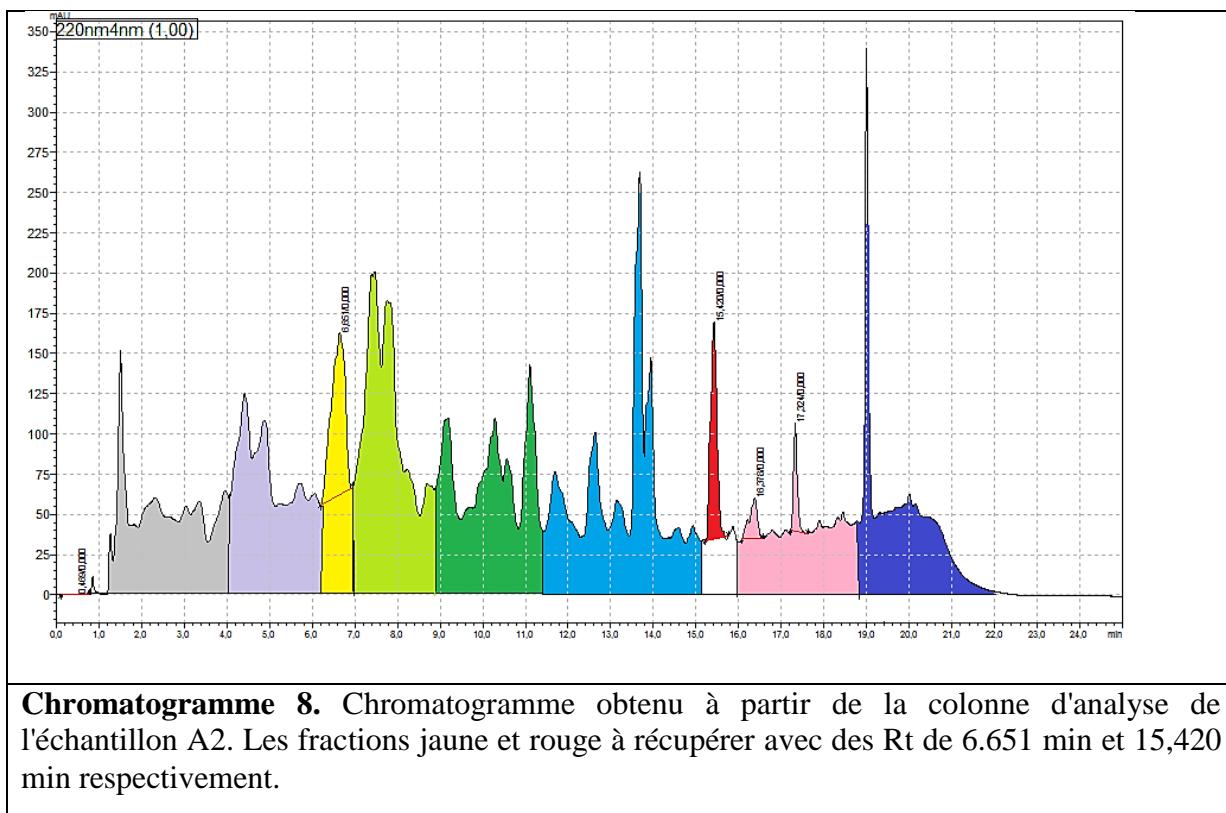
### **Extraction de l'extrait brut (échantillon A2)**

Le développement d'un procédé semi-préparatif a été effectué compte tenu de la nécessité de refaire le protocole de fermentation pour ensuite purifier afin d'obtenir une quantité suffisante. Nous avons réalisé l'extraction du filtrat de culture obtenu par fermentation de l'isolat (D2) après 5 jours incubation (30°C sous agitation 220 rpm) avec deux litres d'acétate d'éthyle. Après extraction, 130 mg d'extrait brut sont obtenus (**échantillon A2**).

### **2) Préparation de l'échantillon A2 pour l'HPLC**

L'extrait brut de l'échantillon **A2** a été solubilisé dans 13 mL de méthanol (10 mg/mL) ensuite un volume de 2 mL a été envoyé au laboratoire de bactériologie au centre hospitalo-Universitaire de Siena - Italie, pour confirmer son activité avant d'effectuer les étapes de la purification et de la séparation des fractions (résultats non représentées).

Une concentration de 4 mg/mL a été utilisée pour effectuer le cycle de purification par HPLC en utilisant la même méthode d'analyse précédemment utilisée pour l'étude de l'échantillon A. Les résultats de l'HPLC illustré par le chromatogramme 8 ont montré un profil A2 correspondant à l'échantillon A2. Ce chromatogramme semble très proche aux deux **chromatogrammes 1 et 2**.



Afin de mieux collecter les fractions actives, nous avons développé une méthode d'HPLC semi-préparative, nommée méthode 2.

Description de la méthode 2 :

- i- Colonne semi-préparative à phase stationnaire RP-C18.
- ii- Mélange de la phase mobile méthanol /eau.
- iii-Gradient d'élution (**Tableau 28**).

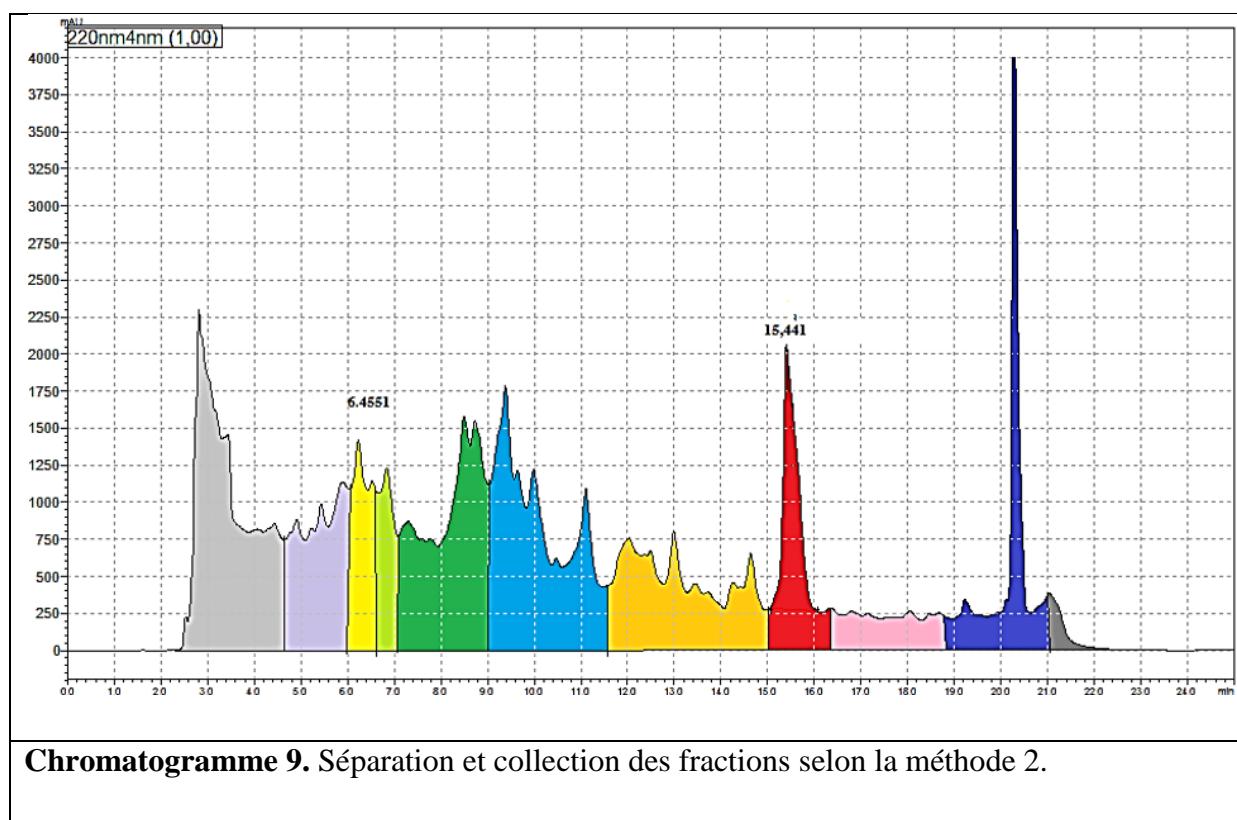
**Tableau 28.** Paramètres de la méthode 2. de la purification de l'extrait brut.

Temps (min)	CH <sub>3</sub> OH (%)	H <sub>2</sub> O (%)			
0.01	10	90	Flux (mL/min)	2.5	
17	100	0	T (° C)	25	
18	100	0	V <sub>inj</sub> ((μ l))	<b>100</b>	
20	10	90	λ (nm)	220	230
25	Fin de Cycle				

La méthode préconisée nous a permis de réaliser une bonne séparation de l'extrait et de collecter ainsi les fractions, permettant d'isoler les pics responsables de l'activité antibiotique. Les résultats obtenus par la méthode 2 sont illustrés par le **Chromatogramme 9** et les fractions collectées sont représentées par le **Tableau 29**.

**Tableau 29.** Fractions recueillies par la méthode 2.

Fractions collectées	Intervalle de Temps (min)	Fractions collectés	Intervalle de temps (min)
A	0 ,01-4	F	11.5-15 .00
B	4- 6.5	H2	<b>15.00-16 .25</b>
C	<b>6.5-7</b>	G	16.25-18 .80
D	7-9	I	18.80-21.00
E	<b>9-11 .5</b>		



Après avoir effectué plusieurs cycles de séparation des fractions actives par HPLC et après épuisement de l'échantillon A2 (130 mg), les fractions intéressantes (actives) de couleur jaune et rouge avec des Rt 15,30 min et 6,80 mn respectivement (chromatogramme 9) ont été analysées par colonne analytique en utilisant le même protocole de purification précédemment cité (Méthode 1d). Les deux pics H et H2 correspondant respectivement aux fractions actives obtenus à partir des deux échantillons A et A2 nous ont permis de procéder à la caractérisation de celles-ci par spectroscopie de masse afin de mettre en évidence leur structure chimique.

## 2. 6. Caractérisation spectrométrique des composés actifs

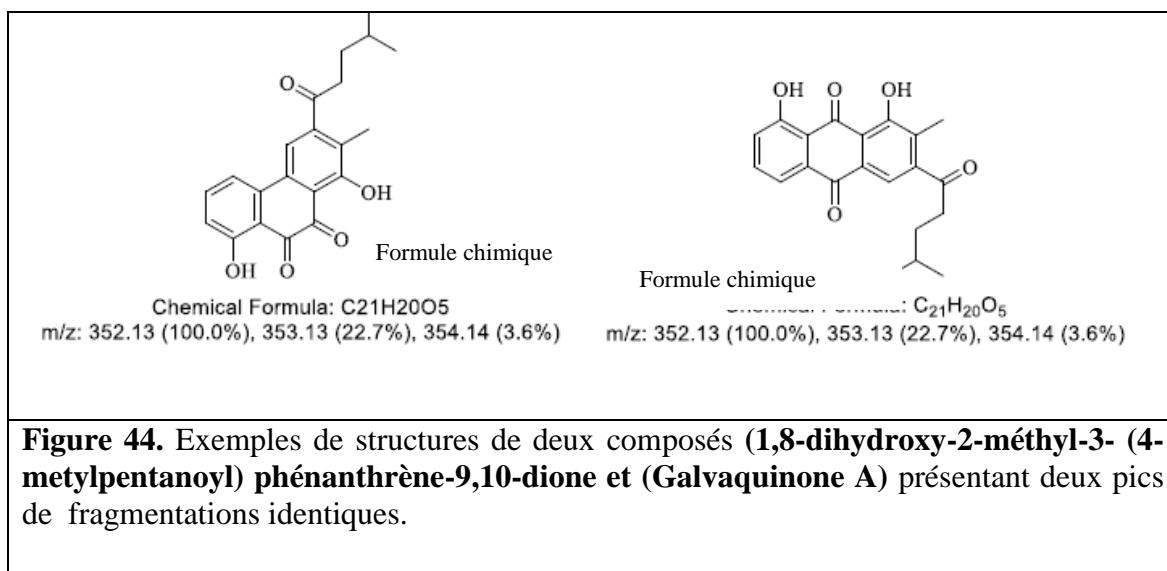
Les fractions collectées ont été envoyées à l'Université de Salerne –Italie pour l'analyse de leur structure chimique par ESI-MS (ionisation par électrospray par spectrométrie de masse) et par ESI-tandem - MS / MS en modes positif et négatif. Les données préliminaires de cette analyse sont présentées en **Annexe V** et dans le **Tableau 27**.

**Tableau 30.** Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse des fractions actives (ESI-MS / MS en mode positif).

Composés	<b>ESI-MS [M+H]<sup>+</sup></b> <b>Pics parents (m/z)</b>	<b>principaux fragments</b>	
		<b>MS<sup>2</sup></b>	<b>MS<sup>3</sup></b>
Composé A (H) RT 15.941 min (0 ,1 mg) Pique active	739.49556	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>
		409.33 → 353.25	353.25 → 335.25
Composé A2 (H2) RT 15.164 min (0 ,12 mg) Impuretés séparer au pique active	931.41013	539.25 → 393.25	

En tenant compte des résultats de l'analyse par spectroscopie de masse, la fraction A2 n'a pas donné de résultats en utilisant la base de données STREPTOMEDB. En revanche, en utilisant ces mêmes bases de données avec la fraction A, ayant une masse de 739,49556 m/z, cette analyse nous a permis d'attribuer à notre composé actif deux structures chimiques rapprochées possibles (**Figure 44**).

Les travaux de **Youcai et al.**, (2012) ont montré que la molécule **Galvaquinone A** est une substance bioactive extraite de l'espèce *Streptomyces spinoverrucosus* isolée à partir du sol du Kuwait.



Selon la valeur de la masse du composé A qui avoisine 739,49556 m/z, le logiciel **Xcalibur** nous a permis à déterminer les structures chimiques élémentaires probables. Ces structures sont indiquées dans le **Tableau 31**. Cette étude sur la caractérisation chimique du composé actif reste insuffisante, il est donc souhaitable d'affiner cette caractérisation par d'autres méthodes telles que la résonance magnétique nucléaire du carbone 13 et proton <sup>1</sup>H, la spectroscopie infrarouge (IR) et ultra-violette (UV). Il est à signaler que la caractérisation par spectroscopie RMN est en cours.

**Tableau 31 :** Formules brutes probables du composé A

Composé	X.X	739.4556	Hétéroatome
Formule Moléculaire (C, H, N, O)	Insaturation	Masse	Azote
C <sub>36</sub> H <sub>71</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	2.5	739.49558	✓
C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub>	7.5	739.49692	✓
C <sub>49</sub> H <sub>63</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	20.5	739.49507	✓
C <sub>33</sub> H <sub>63</sub> N <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	8.5	739.49424	✓
C <sub>38</sub> H <sub>63</sub> N <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	12.5	739.49826	✓
C <sub>48</sub> H <sub>67</sub> O <sub>6</sub>	15.5	739.49373	Non
C <sub>54</sub> H <sub>63</sub> N <sub>2</sub>	24.5	739.49909	Azote seulement
C <sub>32</sub> H <sub>67</sub> N <sub>8</sub> O <sub>11</sub>	3.5	739.49290	✓
Formule Moléculaire (C, H, N, O)	Insaturation	Masse	Azote
C <sub>36</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> NaO <sub>5</sub>	9.5	739.49585	✓
C <sub>52</sub> H <sub>64</sub> N <sub>2</sub> Na	21.5	739.49666	Azote seulement
C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> N <sub>14</sub> NaO	14.5	739.49719	✓
C <sub>39</sub> H <sub>72</sub> NaO <sub>11</sub>	3.5	739.49720	Non
C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> N <sub>6</sub> NaO <sub>9</sub>	4.5	739.49452	✓

[www.sciencefinder.com](http://www.sciencefinder.com) , [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)

---

### **PARTIE III : Etude taxonomique des isolats d'actinobactéries sélectionnés**

#### **III. Etude taxonomique des isolats**

Pour l'identification des isolats, nous nous sommes basés sur des tests macroscopiques, microscopiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires.

A partir des différents échantillons de sol, nous avons isolé et purifié 32 isolats qui correspondaient à notre exigence. Parmi cette collection, trois isolats d'actinobactéries (MS1, D2 et C) présentant une importante activité antibiotique ont fait l'objet d'une étude taxonomique sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques (macromorphologiques et micro-morphologiques), physiologiques, biochimique et moléculaire.

#### **1. Etude des caractères morphologiques (aspect cultural).**

##### **1.1. Etude macroscopique**

Les différentes observations des isolats concernant la croissance, le développement du mycélium aérien et la pigmentation sont rapportées dans le **Tableau 32**.

L'isolat D2 présente une croissance abondante sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5, ISP7 gélosés et milieu Bennett et moyenne sur le milieu GLM. A l'exception des milieux ISP3 et Bennett, qui n'ont enregistré aucune sporulation, une bonne sporulation a été observée sur milieux ISP4, ISP5 et GN suivie d'une faible sporulation sur les milieux ISP7, GLM et MPPM. La couleur du mycélium aérien et du substrat varie selon le milieu utilisé, du blanc au beige brun orange au marron. Aucun pigment diffusible n'est sécrété sur les différents milieux de cultures utilisés.

L'isolat **MS1** présente une croissance et une sporulation abondante sur les milieux ISP4, ISP7, GN, MPPM et Bennett, moyenne sur les milieux ISP5, ISP2, et GLM et relativement faible sur le milieu ISP3. Une sporulation faible a été observée sur ISP3, ISP5, GLM. La production du mycélium aérien (MA) et de substrat (MS) est observée sur tous les milieux avec des couleurs différentes. La production de pigment diffusible de couleur brunâtre a été observée sur les milieux ISP2, ISP4, Bennett, GLM et MPPM alors qu'aucun pigment diffusible n'a été observé sur les milieux ISP3, ISP4, ISP5 et ISP7.

Chez l'isolat C, nous avons observé une bonne croissance sur les milieux ISP2, ISP4, GN, et GLM, relativement moyenne sur les milieux ISP5 et ISP7 et faible sur les milieux ISP3, MPPM et Bennett. La sporulation de l'isolat C est moyenne à faible sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5, ISP7 et GLM, et absente sur les milieux ISP3, Bennett et MPPM.

production de pigments solubles (diffusibles dans les milieux) très faible ou des fois absent a été constatée sur les différents milieux de cultures utilisés. Les observations des mycéliums aériens et du substrat sont rapportés dans le Tableau 32. (**Annexe II**)

Le mycélium aérien présente différentes couleurs. Cette variation de couleur dépend de la composition de milieu de culture ainsi que l'âge de la culture d'actinobactérie (**Awad et al., 2009**).

**Tableau 32.** Caractéristiques macromorphologiques des isolats d'actinobactéries sélectionnées après 21 jours d'incubation.

Milieux de culture	Isolat D <sub>2</sub>	Isolat MS1	Isolat C
Milieu Isp <sub>2</sub>	Croissance : +++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : gris rougeâtre Mycélium du substrat : marron foncé Pigments solubles : -	Croissance : ++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : blanc cassé mycélium du substrat : marron foncé Pigments solubles : +	Croissance : +++ Sporulation : ++ Mycélium aérien : rose grisâtre mycélium du substrat : orange jaune Pigments solubles : -
Milieu Isp <sub>3</sub>	Croissance : + Sporulation : - Mycélium aérien : - mycélium du substrat : beige pâle Pigments solubles : +	Croissance : + Sporulation : + Mycélium aérien : blanc mycélium du substrat : beige pâle Pigments solubles : -	Croissance : + Sporulation : - Mycélium aérien : - mycélium du substrat : beige pâle Pigments solubles : +
Milieu Isp <sub>4</sub>	Croissance : +++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : gris clair brunâtre mycélium du substrat : brun jaunâtre Pigments solubles : -	Croissance : +++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : beige foncé mycélium du substrat : gris foncé Pigments solubles : +	Croissance : +++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : gris claire brunâtre mycélium du substrat : rose brun Pigments solubles : +
Milieu Isp <sub>5</sub>	Croissance : +++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : blanc mycélium du substrat :	Croissance : ++ Sporulation : + Mycélium aérien : blanc mycélium du substrat :	Croissance : ++ Sporulation : + Mycélium aérien : blanc mycélium du substrat : jaune

	jaune orange claire Pigments solubles : -	brun jaunâtre pâle Pigments solubles : -	pâle Pigments solubles : -
Milieu Isp <sub>7</sub>	Croissance : +++ Sporulation : + Mycélium aérien : gris clair mycélium du substrat : gris foncé Pigments solubles : -	Croissance : +++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : blanc jaunâtre mycélium du substrat : orange modéré Pigments solubles : -	Croissance : ++ Sporulation : + Mycélium aérien : gris jaunâtre mycélium du substrat : jaune grisâtre Pigments solubles : -
Milieu Bennett	Croissance : + Sporulation : - Mycélium aérien : jaune modéré mycélium du substrat : jaune brillant Pigments solubles : -	Croissance : +++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : blanc mycélium du substrat : orange foncé Pigments solubles : +	Croissance : + Sporulation : - Mycélium aérien : - mycélium du substrat : jaune orangé Pigments solubles : +
Milieu GN	Croissance : +++ Sporulation : + Mycélium aérien : jaune pâle vert mycélium du substrat : jaune pâle Pigments solubles : -	Croissance : +++ Sporulation : +++ Mycélium aérien : beige mycélium du substrat : jaune orangé claire Pigments solubles : +	Croissance : +++ Sporulation : ++ Mycélium aérien : gris mycélium du substrat : brun jaunâtre moyen Pigments solubles : -
Milieu GLM	Croissance : ++ Sporulation : + Mycélium aérien : blanc mycélium du substrat : jaune orange Pigments solubles : -	Croissance : ++ Sporulation : + Mycélium aérien : beige mycélium du substrat : brunâtre orange Pigments solubles : +	Croissance : +++ Sporulation : + Mycélium aérien : gris mycélium du substrat : jaune modéré Pigments solubles : +
Milieu MPPM	Croissance : + Sporulation : N- Mycélium aérien : - mycélium du substrat : - Pigments solubles : -	Croissance : +++ Sporulation : ++ Mycélium aérien : beige mycélium du substrat : marron jaunâtre foncé Pigments solubles : +	Croissance : + Sporulation : - Mycélium aérien : gris mycélium du substrat : marron jaunâtre Pigments solubles : +

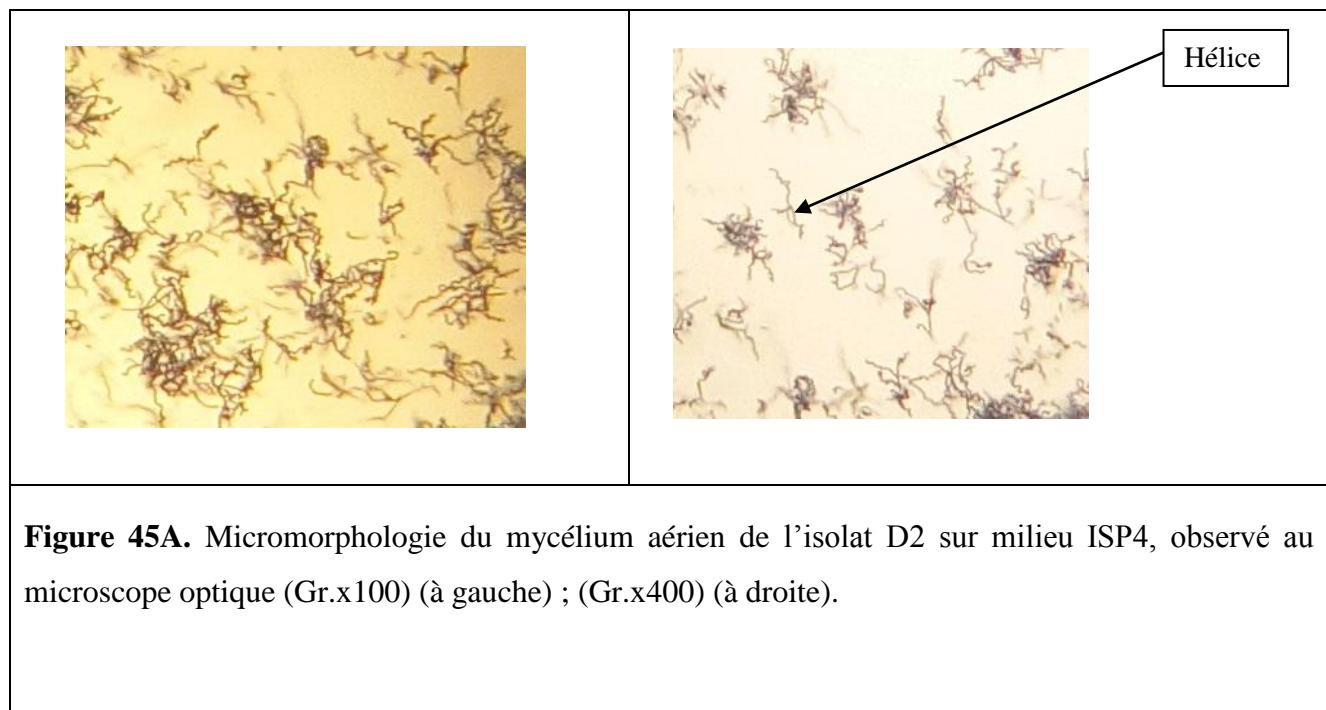
MA : mycélium aérien ; MS : mycélium du substrat ; PS : pigments solubles ;

(++) : Importante ; (++) : Moyenne ; + : Faible ; - : Nulle.

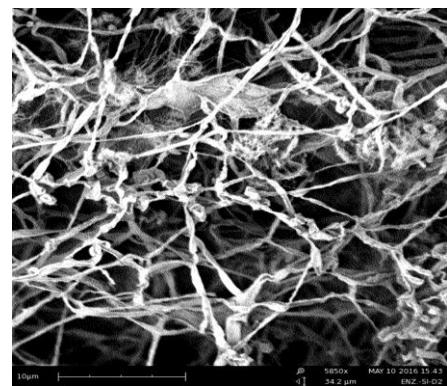
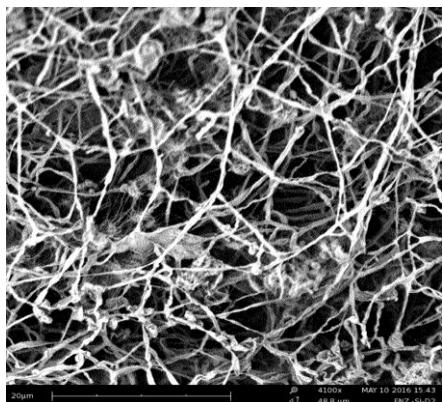
## 1.2. Etude microscopique

Les isolats D2, C, MS1 sont ensemencés sur le milieu ISP4, présentant une bonne croissance et une meilleure sporulation. Ils sont ensuite observés sous un microscope optique (Optika) au grossissement (x10 et x40) après 14 jours d'incubation à 30°C. Les observations microscopiques sont représentées par les **Figures 45 à 47**.

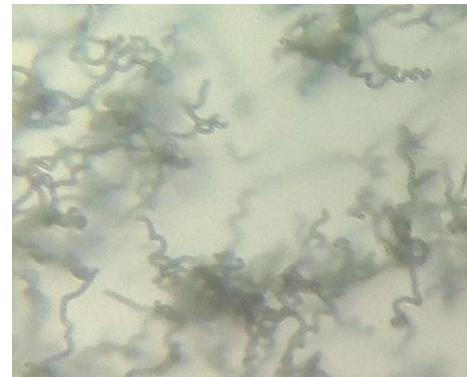
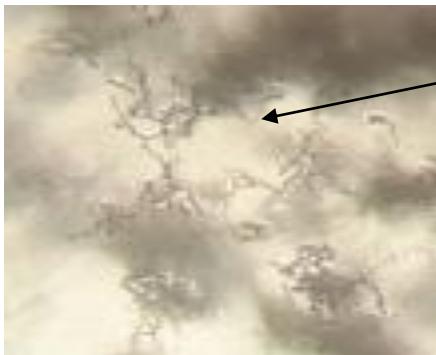
Les trois isolats produisent un mycélium du substrat non fragmenté et un mycélium aérien constitué de filaments ramifiés qui se terminent par des chaînes de spores portés par des sporophores de différentes formes. La morphologie des chaines est plus ou moins variable selon l'isolat d'actinobactérie. Ces chaines ont des formes spirales pour les isolats D2 et C comme chez les espèces de *Streptomyces hygroscopicus* et *S. griseus*, droites à flexueuses (type RF) pour l'isolat MS1, soit un *Streptomyces* de type RF (*Rectus Flexibilis* ou rectiflexibles = chaînes droites à flexueuses) caractéristique du genre *Streptomyces* (**Bergey Manuel, 2012**).



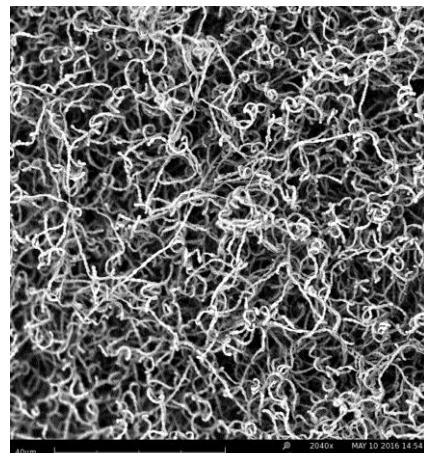
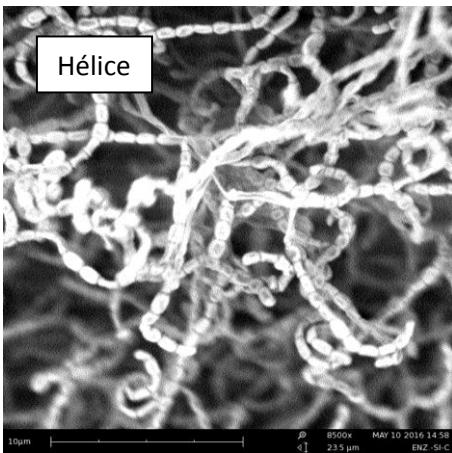
**Figure 45A.** Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat D2 sur milieu ISP4, observé au microscope optique (Gr.x100) (à gauche) ; (Gr.x400) (à droite).



**Figure 45B.** Observation au microscope électronique à balayage (Gr. x 3800) de l'isolat D2



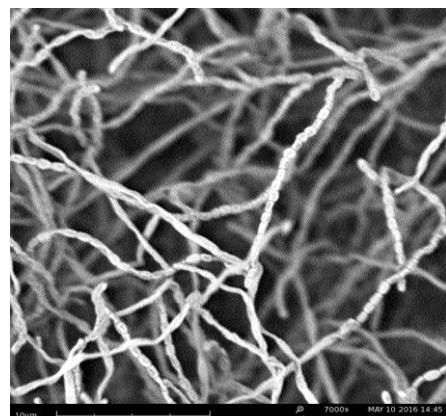
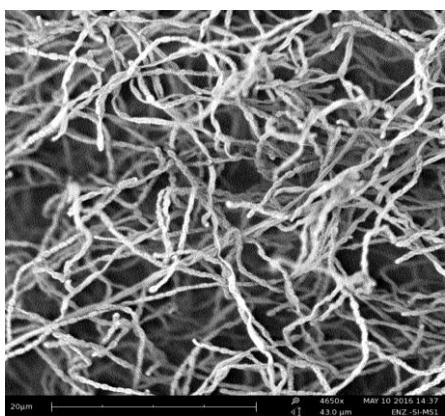
**Figure 46A.** Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat C poussant sur milieu ISP4 et observé au microscope optique (Gr.x100) (à gauche) (Gr. x400) (à droite).



**Figure 46B.** Observation au microscope électronique à balayage (Gr. x 3800 et 3000) de l'isolat C.



**Figure 47A.** Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat **MS1** sur milieu ISP4 et observé au microscope optique (Gr. X100) (à gauche) et (Gr. X400) (à droite)



**Figure 47B :** Observation au microscope électronique à balayage de l'isolat **MS1** (Gr x 3000) et (G x 3800).

L'observation au microscope électronique de l'isolat C révèle parfois des espaces entre les spores, ce qui exclut son appartenance au genre *Saccharothrix*. Ces observations microscopiques n'ont pas permis de visualiser les sporophores (caractéristiques des *Streptomyces*). Cependant, les sporophores peuvent être masqués par une masse importante de spores.

L'isolat D2 présente une très faible sporulation, présence de quelques spores visibles et espacées entre elles. Ce critère peut nous rapprocher du genre *Streptomyces*. Chez l'isolat MS1, nous avons observé une bonne sporulation, avec un sporophore de type RF (chaînes droites à flexueuses).

L'étude des caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques) des isolats d'actinobactéries est largement utilisée pour caractériser les genres d'actinobactéries. Selon **Shirling et Gottlieb, 1976**, l'identification des actinobactéries repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables.

Selon (Williams *et al.*, 1993) grâce aux caractéristiques morphologiques, certains genres d'actinobactéries (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*...) peuvent être identifiés avec un important degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinoinmadura*...).

Sur la base des observations macroscopiques (croissance, aspect et pigmentation) et microscopiques (chaines de spores de type S, RF ou RA), les trois isolats montrent les traits de ressemblance typiques liés au *Streptomyces*, considéré comme le genre le plus abondant dans le sol. Ce résultat rejoint l'observation faite par **Locci et al., 1989** citée par **Thakur et al., 2007** que les souches présentant une croissance sur une large gamme de milieu de culture, montrent généralement une morphologie typique des Streptomycètes.

A travers cette étude, nous pouvons conclure que les 03 isolats correspondent au genre *Streptomyces*. La morphologie de ce genre d'actinobactérie est très particulière ; les colonies sur milieu de culture présentent un aspect irrégulier, de taille plus ou moins importante et souvent colorées. Les mycéliums aérien et du substrat sont très évolués, complexes et persistants. Les hyphes du mycélium aérien sont constitués par de longues chaines de spores allant de 30 à 50, droites ou flexueuses. Le mycélium du substrat est stérile et ne se fragmente pas **Bergey Manuel, 2012**. La couleur du mycélium aérien des trois isolats MS1, C et D2 est généralement grisâtre. Ce caractère permet de les classer dans la série des *Streptomyces* "Gris".

Les travaux de **Muiru et al., 2008**, révèlent que les milieux de culture utilisés pour l'identification des actinobactéries n'ont pas d'impact sur les caractères morphologiques, mais plutôt sur les caractéristiques physiologiques comme la production de pigments mélanoïdes.

Ce paramètre est recherché sur les milieux MPPM et ISP7 (tyrosine agar), qui permet de mettre en évidence la production de l'enzyme tyrosinase, responsable de la production des mélanoïdes (**le Hose et al., 2015** ; **Harir et al., 2017**).

### **1.3. Coloration de Gram**

Les frottis bactériens des trois isolats sont colorés par la coloration de Gram puis observé au microscope optique à l'objectif (Gr. X 100).

L'examen microscopique a montré que la totalité des isolats sont des bactéries filamenteuses à Gram positif, ayant des formes similaires aux actinobactéries (**Figure 48**). Après la caractérisation morphologique ainsi que la coloration de Gram, les isolats pouvaient donc être assimilés au genre *Streptomyces*. Ce résultat est en accord avec les travaux de (**Debananda et al., 2009**).

Isolats	Aspect macroscopique	Coloration de Gram
D2		
MS1		
C		

**Figure. 48 :** Observation microscopique des trois isolats d'actinobactérie (Gr. x1000) après coloration de Gram.

## 2. Résultats de l'étude physiologique

### 2.1. Tests de sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité et la résistance des isolats ont été évaluées selon les critères suivants :

Diamètre  $\geq$  à 15 mm = isolat sensible ;  $\leq$  à 15 mm = isolat résistant.

Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques réalisés sur les trois isolats D2, MS1 et C sont représentés dans le **Tableau 33**. A titre de comparaison, nous avons introduit la souche de référence *S. aureus*.

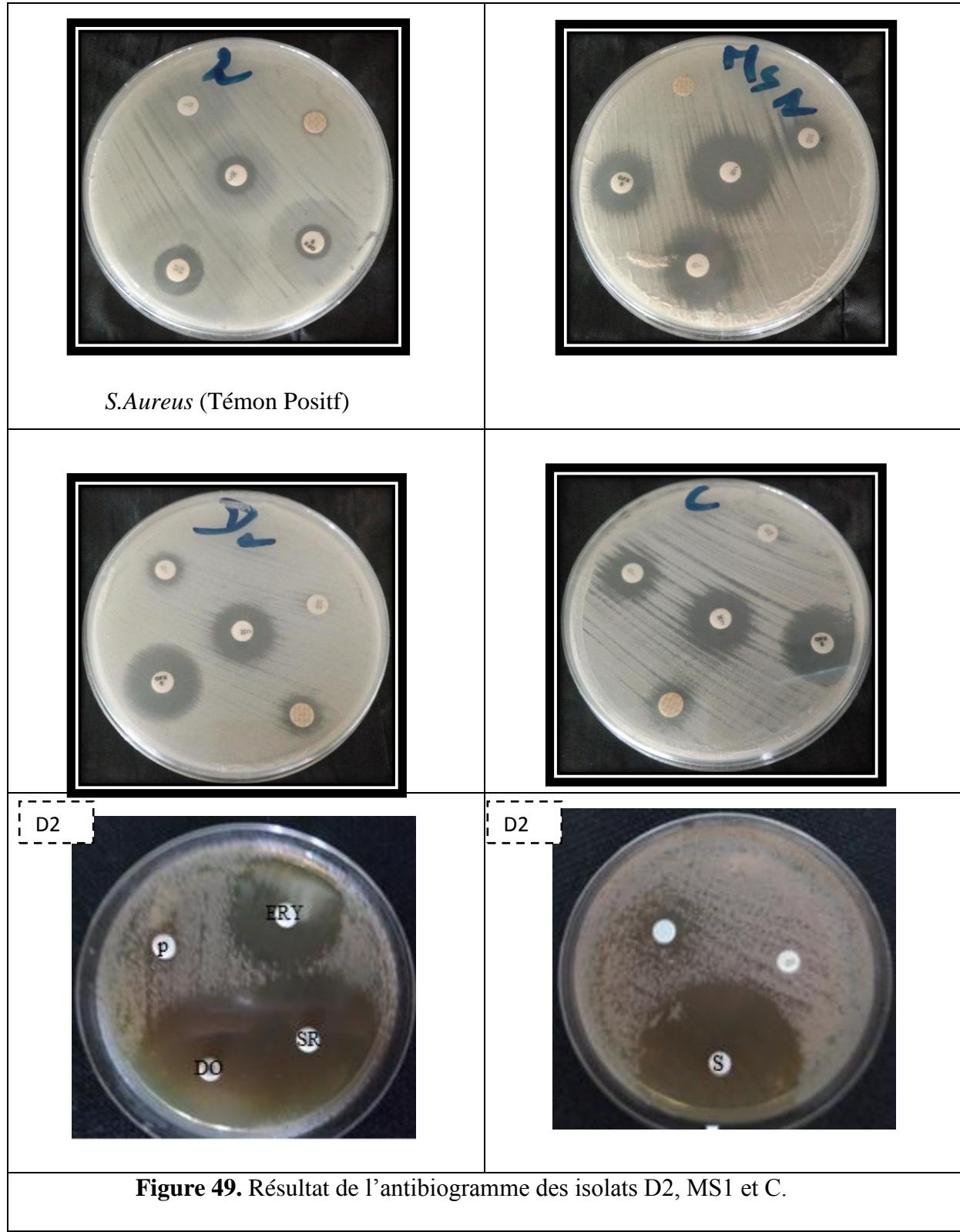
D'après les résultats, l'isolat D2 s'est montré sensible à la majorité des antibiotiques testés, dont la zone d'inhibition varie entre 17 et 53 mm de diamètre. Ce même isolat s'est révélé résistant à la linocomycin et la nitrofirantoin.

**Tableau 33.** Sensibilité des isolats d'actinobactéries aux différents antibiotiques.

Antibiotique	Diamètre de zone d'inhibition (mm)			
	<i>S. aureus</i> ATCC10876	D2	MS1	C
Chloramphénicol	12	17	23	20
Oflaxacin	10	23	20	25
Linocomycin	23	11	12	19
Amoxicilline	14	00	00	00
Nitrofirantoin	00	12	nd	00
Erythromycine (ERY)	nd	35	nd	nd
Pénicilline-G (P))	nd	00	nd	nd
Spiromycine (SR)	nd	45	nd	nd
Doxycycline (DO)	nd	47	nd	nd
Streptomycine (S)	nd	<b>53</b>	nd	nd

Nd : non déterminé.

L'isolat MS1 s'est révélé sensible à la Chloromaphénicol (C), à l'Oflaxacin (Ofx) et à la Linocomycin (L) avec une zone d'inhibition variant de 20 à 23 mm, alors qu'il s'est montré résistant à la Nitrofirantion (N) et à l'Amoxicilline. Enfin, L'isolat C s'est montré sensible à la Chloromaphénicole (C), l'Oflaxacin (Ofx) et à la linocomycin (L) avec des zones d'inhibition de 20, 25 et 19 mm respectivement et résistant à l'Amoxicilin et la Nitrofirantoin (N). Les résultats de d'antibiogramme sont illustrés par la **Figure 49**.



**Figure 49.** Résultat de l'antibiogramme des isolats D2, MS1 et C.

## **2.2. Production de pigments mélanoïdes**

Les résultats illustrés par la **Figure 31** montrent que l'isolat MS1, est le seul et l'unique isolat qui possède l'enzyme tyrosinase responsable de la production des pigments mélanoïdes sur les deux milieux utilisés (ISP7 et MPPM). Les deux autres isolats se sont montrés dépourvus de cette enzyme.

Selon (**Kampfer, 2006**), la production des pigments dépend généralement de la composition du milieu et des conditions de culture. D'après la littérature, la production de ces pigments est l'un des caractères des Streptomycètes et que la coloration des mycéliums du substrat et aérien est due à ces pigments mélanoïdes. La mélanine est un substrat commun, produit par les animaux, les plantes et les microorganismes. Elle a un faible poids moléculaire, formée par la polymérisation oxydative des produits phénoliques ou indoliques (**Vasantha bharthi et al., 2011**).

## **3. Résultats de l'étude physiologique et biochimique**

Les résultats de l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques sont rapportés dans le **Tableau 34**. Les trois isolats sont physiologiquement différents entre eux pour certains caractères physiologiques alors qu'ils partagent d'autres caractères physiologiques notamment, l'hydrolyse de l'amidon, de la gélatine et leur sensibilité aux inhibiteurs testés. Les trois isolats sont également catalase positive, citrate négatif et indole négatif et enfin, ils n'hydrolysent pas le tween 80.

Le reste des caractères physiologiques a permis de les différencier. Tout d'abord, l'isolat MS1, est le seul et l'unique isolat qui possède l'enzyme tyrosinase responsable de la production des pigments mélanoïdes. Les deux autres isolats se sont montrés dépourvus de cette enzyme. L'isolat MS1 et C ont la capacité d'hydrolyser la caséine, ce même test s'est révélé négatif en présence de l'isolat D2. Le test de l'hydrolyse de tyrosine montre que l'isolat MS1 hydrolyse la tyrosine alors qu'il s'est révélé négatif en présence des deux autres isolats. Le test de dégradation de l'urée s'est révélé positif chez l'isolat D2 et C tandis que, chez MS1, le test est négatif.

Enfin, les tests de la mise en évidence de la source de carbone et d'azote mont montré que l'ensemble des isolats d'actinobactéries utilisent les différents sucres testés comme source de carbone ; ces même isolats utilisent également les acides aminés testés (proline et L-leucine) comme source d'azote excepté la glycine.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les isolats sélectionnés possèdent une meilleure croissance surtout sur le milieu contenant le fructose ou le saccharose

comme source de carbone et hydrolysent mieux la caséine, l'amidon et la gélatine. Ces caractéristiques répondent aux critères retenus par **Remya et Vijayakumar (2008)** pour l'identification de plusieurs espèces de *Streptomyces*.

**Tableau 34.** Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats D2, MS1 et C.

Propriétés	MS1	D2	C
Production de mélanine (Tyrosinase)	+	-	-
Les inhibiteurs (Phénol, pénicilline, amoxicilline)	-	-	-
Hydrolyse de l'Amidon (Enzyme $\alpha$ amylase)	+	+	+
Hydrolyse de gélatine (gélatinase)	+	+	+
Hydrolyse de la caséine de lait	+	+	+
Hydrolyse de Tyrosine	+	-	+
Hydrolyse de tween 80	+	-	-
Production de la catalase	+	+	+
Production de H <sub>2</sub> S	+	-	-
Test de citrate	-	-	-
Dégénération de l'Urée	-	+	nd
Production d'indole	-	-	-
Utilisation des sucres comme source de carbone			
Témoin négative	-	-	-
D- glucose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Xylose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	+	+	+
L- rhamnose	+	+	+
D- fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Saccharose	+	+	+
Utilisation des acides de Sodium			
Acétate de sodium	-	-	-
Oxalate de sodium	-	-	-
Utilisation des acides aminés			
Proline	+	+	+
I- leucine	+	+	+
Glycine	-	-	-

(+) : test positif ; (-) : test négatif ; Nd : non déterminé

**4. Résultats de l'étude des paramètres physico-chimiques**

Cette étude a permis d'évaluer les potentialités des isolats à se développer à différentes températures, à différentes valeurs de pH et à différentes concentrations de Na Cl. L'étude des paramètres physiques a permis d'obtenir les résultats qui figurent dans le **Tableau 35**. Ces résultats montrent que l'ensemble des isolats se développent à 25, 30 et 40°C et pas à 5 et 50°C. Ces isolats présentent une croissance plus ou moins modérée à différentes concentrations de NaCl (4 à 10 %), excepté l'isolat C, qui s'est montré sensible à des concentrations égal ou supérieur à 6%. On note que la croissance optimale est enregistrée en présence des trois premières concentrations de Na Cl. Cette étude a également montré que nos isolats ont la capacité de croître dans un milieu à différentes valeurs de pH à l'exception du pH=3.

**Tableau 35.** Tests de croissance des isolats d'actinobactéries sur le milieu ISP2 et à différentes températures, pH et concentrations du Na Cl

isolats	Croissance à différentes Températures					Croissance à différents pH (T° 30 C)						Croissance à différentes concentration de Na Cl (%) (T° 30 C)									
	5° C	25° C	30° C	40° C	50° C	3	5	7	9	11	1%	2%	3%	4%	5 %	6%	7%	8%	9%	10%	11%
D2	-	+	++ +	-	-	-	+	++	+	-	++ +	+++	++ +	++	++	++	++	++	++	++	++
MS1	-	++	++ +	+	-	-	+	++	+	++	++ +	+++	++ +	++	++	++	++	++	++	++	++
C	-	+	++ +	+	-	-	-	++	+	++	++ +	+++	++ +	++	++	++	++	++	++	++	-

Note : (-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modérée, (+++) croissance abondante.

### **Discussion**

Pour l'identification de nos isolats, nous nous sommes basés sur des tests macroscopiques, microscopiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires. L'étude macroscopique nous a permis de déterminer les caractères cultureaux de nos isolats. Quant à l'étude microscopique, elle nous a permis de différencier les isolats selon leur organisation sporale. Les tests biochimiques et physiologiques ont montré selon que les isolats d'actinobactéries sont physiologiquement différents entre eux pour certains caractères. En revanche pour d'autres caractères, ces isolats se sont révélés physiologiquement similaires. Le résultat de ces tests nous a permis de conclure que nos isolats sont représentés en grande majorité par le genre *Streptomyces*.

L'étude des caractères physiologiques des isolats est importante pour déterminer les espèces d'actinobactéries (**Bergey's Manual, 2012**). Cependant, cette étude reste insuffisante pour déterminer la ou les espèces de ce genre d'actinobactérie sans le recours à la taxonomie numérique et à l'application de tests statistiques (**Sneath, 1989**). En outre, ces tests sont intéressants par le fait qu'ils indiquent certaines caractéristiques physiologiques importantes pouvant être utiles pour la sélection des isolats performants.

Les tests d'antibiogramme ont montré que l'ensemble des isolats présentent une résistance aux antibiotiques. Selon **Marcone et al., (2010)**, la résistance des isolats à certains antibiotiques suggère leur aptitude à la production de ces molécules car dans la nature, la production d'antibiotiques suppose que le microorganisme possède un mécanisme de résistance à ces métabolites. Les gènes de résistance et ceux de biosynthèse des antibiotiques, situés dans le même «groupe», sont transcrits simultanément, ce qui assure la protection du germe producteur (**Martin, 1992**). Nous avons constaté aussi que l'ensemble des isolats avaient la capacité de dégrader la majorité des composés organiques, de croître à différentes valeurs de pH et à une température avoisinant 40°C. Selon **Shirling et Gattlieb, 1966 ; Holt et al., 1994 ; Kim et al., 1999 ; Petrosyan et al., 2003**, les streptomycètes sont des germes aérobies, chimio-organotrophes, se caractérisent par une catalase positive et ont un métabolisme oxydatif. Ils utilisent une large gamme de composés organiques comme seule source de carbone et d'énergie. Ils réduisent le nitrate et dégradent l'adénine, l'esculine, la caséine, la gélatine, l'hypoxantine, l'amidon et la tyrosine. La température optimale de croissance se situe entre 25 à 35°C. Quelques espèces sont psychrophiles et d'autres thermophiles et peuvent tolérer une température de 55 °C.

Le pH optimum se situe généralement dans l'intervalle de 6,5 à 8,0 alors qu'il existe certaines espèces qui sont alcalophiles et se développent à un pH de 11.

## **5. Résultats de l'étude moléculaire**

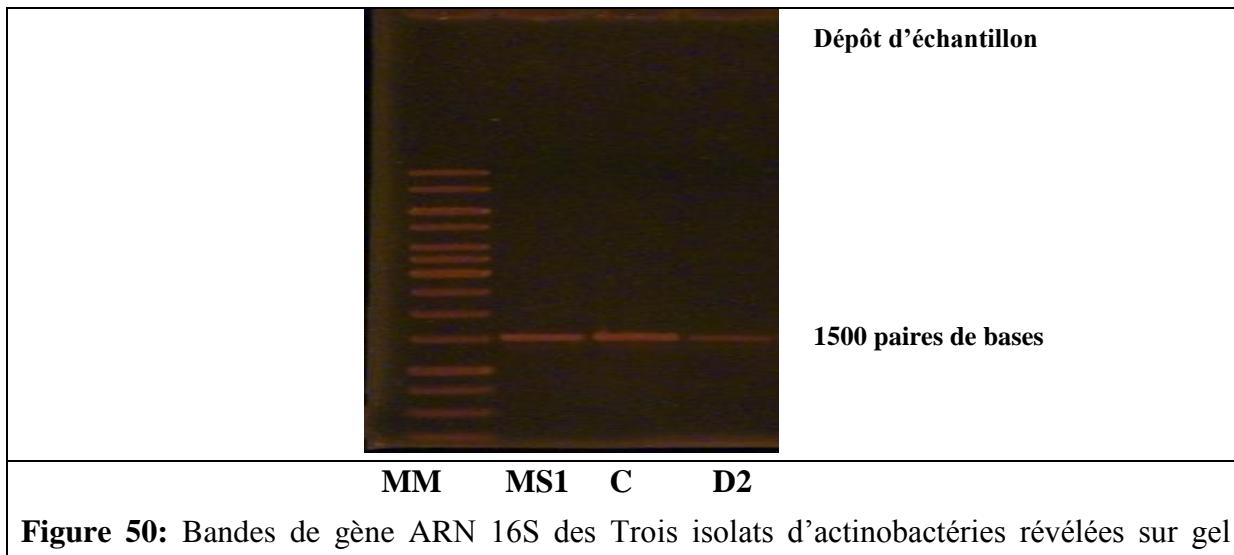
Bien que la détermination phénotypique constitue une partie indispensable et essentielle à l'identification des micro-organismes du sol, elle est cependant imprécise et limitée. Afin d'affiner nos résultats, une caractérisation moléculaire est nécessaire. Elle a été réalisée sur trois isolats choisis selon les tests d'antagonisme vis-à-vis des bactéries pathogènes.

### **5.1. Identification moléculaire des espèces (séquençage de gène de l'ARNr 16S)**

Les tests d'identification traditionnelle basés sur des essais minutieux et physiologiques ne donnent pas souvent de résultats précis et fiables pour la détermination précise des espèces bactériennes. Ces dernières années, plusieurs techniques moléculaires d'analyses de fragments d'ADN sont utilisées avec succès sur différents micro-organismes. Toutes ces techniques sont basées sur une amplification par PCR de l'ADN des microorganismes. Les produits PCR ont été ensuite analysés par le séquençage. Trois isolats de notre collection bactérienne (MS1, D2 et C) ont fait l'objet de cette étude. La confirmation de leur identification a été réalisée par PCR suivi d'un séquençage (**Figure 50 et 51**). Cette partie de ce travail a été réalisée au laboratoire de microbiologie et virologie de l'hôpital universitaire de Carruggi, Florence – Italie.

Le produit de séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S des isolats était de mauvaise qualité, à l'exception de l'isolat MS1. Chez ce dernier, nous avons pu obtenir la séquence complète du gène de l'ARN 16S. Ces séquences ont été analysées par l'outil "BLAST" dans le portail NCBI (national center of biotechnology information). Les résultats ont montré des taux avoisinant les 100 % de similarité avec de nombreuses espèces appartenant au genre *Streptomyces* (**Figure 52**). Dans notre cas, nous pouvons dire que le séquençage de l'ARN ribosomique 16S n'est pas le protocole adéquat pour une identification précise et fiable de nos isolats. Selon certains travaux, le séquençage de ce fragment n'aboutit pas à l'identification de l'espèce et demande d'intégrer dans la plupart des cas des séquences de gènes de ménage (Housekeeping gene) qui sont présents dans le chromosome de l'espèce et qui présentent rarement voir jamais des mutations au cours de l'évolution (**Guo et al., 2008 ; Labeda et al., 2011**). Les résultats après le BLAST de la séquence complète de gène 16S de l'isolat MS1 nous ont orientés vers le séquençage du génome total de l'isolat D2, producteur d'antibiotique aussi bien de l'isolat MS1 producteur de tyrosinase.

L'identification moléculaire de ce dernier, est en parfaite accord avec les résultats de l'étude morphologique et microscopique puisqu'elle a permis de confirmer l'identification de cet isolat au niveau du genre *Streptomyces* (**Figure 52**).



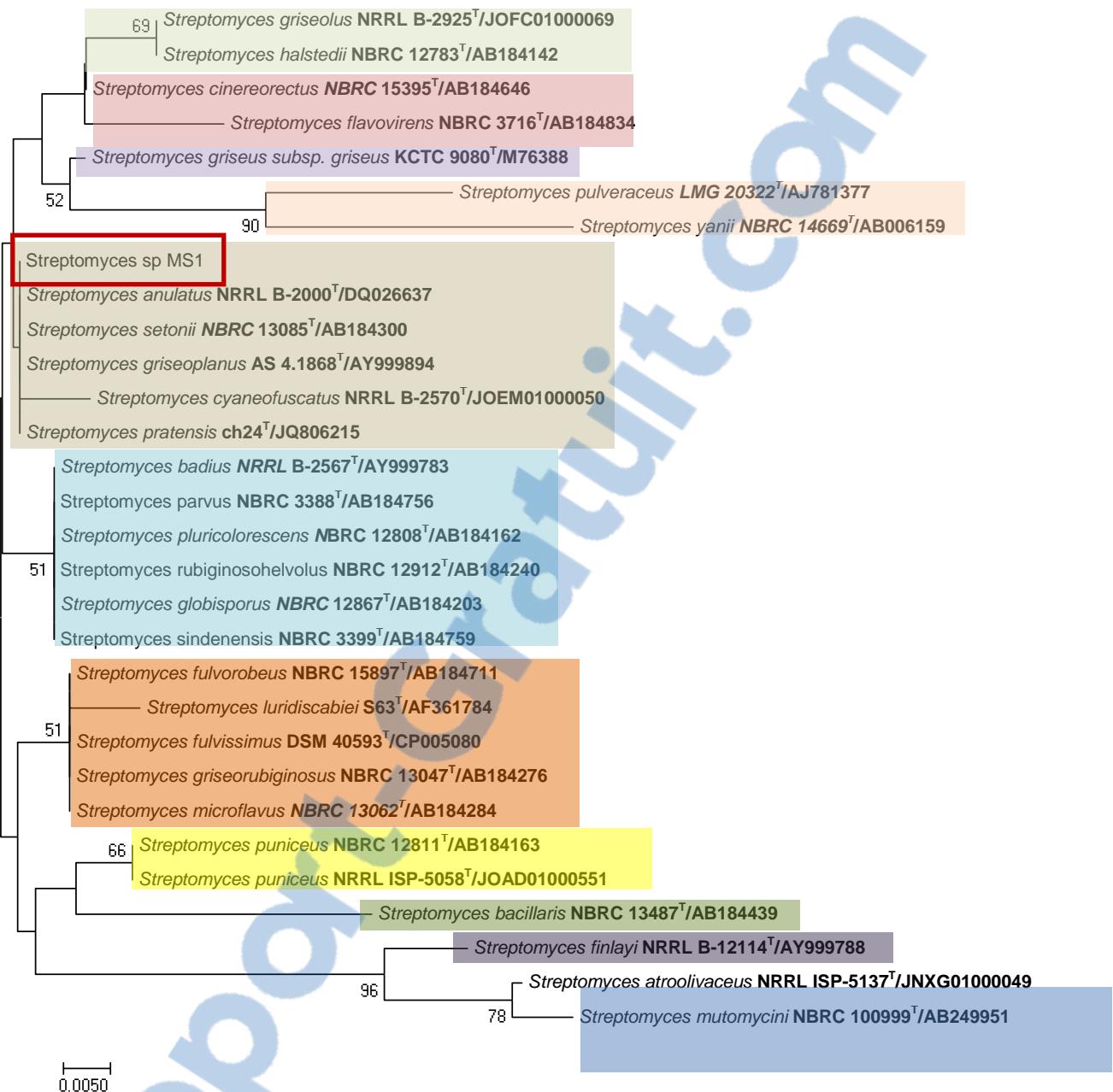
**Figure 50:** Bandes de gène ARN 16S des Trois isolats d'actinobactéries révélées sur gel d'agarose après amplification par PCR.

➤ 16S\_MS1\_assembled080716 **MG571614**

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG571614>)

```
GGCGGGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCTTCCGGGGATTAGTGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGGCAACTGCCCTCACTCTGGACAAGCCCTGGAAACGGGGCTAATACCG
GATAACACTCTGTCCCAGGGACGGGTTAAAAGCTCCGGCGTGAAGGATGAGCCCGGGCC
TATCAGCTTGGTGGGGTAATGCCCTACCAAGGCAGCAGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGA
CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCA
CAATGGCGAAAGCCTGATGCGAGCGACGCCGTGAGGGATGACGCCCTCGGGTTGAAACCTC
TTTCAGCAGGGAAGAAGCAGGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAATACGTGCCAG
CAGCCGCGTAATACGTAGGGCGAACCGTTGCGGAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC
GGCTTGTCACTCGGATGTGAAAGCCGGGCTTAACCCGGCTGCATTGATACGGGCTAGCT
AGAGTGTGGTAGGGAGATCGGAATTCTGGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAAC
ACCGGTGGCGAAGGCAGCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAA
CAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGACTAGGTGTTGGCGACATTCCACG
TCGTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCAGCGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAAGGCTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTCCCCCTTGTGGTCGGTATAC
AGGTGGTGCATGGCTGTCGTCACTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGAGCGCAA
CCCTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTCGGGGTGATGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCA
ACTCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTATGTCTTGGCTGCACACGTGCT
ACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGATGCCGAGGCAGCGAATCTCAAAAGCCGGTCTCAG
TTCGGATTGGGGCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGATTG
CTGCGGTGAATACGTTCCCAGGCCCTGTACACACCGCCGTACGTCACGAAAGTCGGTAACACCC
GAAGCCGGTGGCCCAACCCCTGTGGGAGGGAGC
```

**Figure 51 :** Séquence complète (5'----3') du gène d'ARN 16S de la souche MS1.



**Figure 52.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'ARNr 16S montrant les relations entre l'isolat MS1 et les souches-types des espèces du genre *Streptomyces*. Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les pourcentages du support « bootstrap » effectués par la méthode du « neighbor-joining ». Ne sont donnés que les pourcentages supérieurs à 50%. La barre indique 0,005 substitutions par position de nucléotide. Les numéros des séquences des souches sont donnés en gras.

L'amplification du fragment 16S reste peu performante comme outil d'identification pour certains genres au sein desquels les variations de séquences sont trop minimes entre espèces pour permettre de les distinguer, c'est le cas par exemple de la bactérie : *Mycobacterium spp.* ; Certaines espèces de streptocoques (*Streptococcus mitis*, *S. oralis* et *S. pneumoniae*) ; les entérobactéries (*Escherichia coli* et *Shigella*) ou encore *Bacillus spp.* (*Bacillus cereus* et *B. anthracis*) (**Mignard et Flandrois, 2006 ; Janda et Abbott, 2007 ; Petti, 2007**). Dans ces cas où les séquences de l'ARN 16S varient peu entre espèces, on ne peut distinguer les espèces proches. D'autres gènes sont alors proposés pour distinguer ces espèces ; par exemple le gène *rpoB* qui code pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase et qui est présent en une seule copie dans les génomes bactériens a démontré son utilité chez les mycobactéries (**Petti, 2007 ; Adekambi et al. 2009**).

Certains organismes ont 06 copies du gène ARNr 16S (**Kim et al., 2007**) qui peuvent présenter des variations entre eux, ce qui a pour conséquence de générer des séquences contenant des ambiguïtés (**Petti, 2007**). De plus, un certain degré de « microhétérogénéité » au sein des espèces a été rapporté, ce qui correspond à des variations inférieures à 0,5% intra-espèces et aux différents génotypes des sous-espèces (**Clarridge, 2004**).

## **5.2. Identification moléculaire des deux isolats (D2 et Ms1)**

### **5.2.1 Extraction de l'ADN génomique des deux isolats (D2 et MS1).**

Les deux isolats D2 et MS1 ayant montré des propriétés antibiotiques intéressantes en plus de la production de tyrosinase par l'isolat MS1 ont été retenues pour le séquençage de génome entier.

Chaque isolat a été ensemencé sur milieu Jasenka puis incubé à 30 °C pendant 40 h. Ensuite, 1 mL de cette culture a été utilisé pour la récolte de mycélium par centrifugation à 10000 x g pendant 10 minutes. Le mycélium obtenu a été dissout dans 500 µl de tampon SET (75 mM de Na Cl, 25 mM d'EDTA, 20 mM de TrisHCl à pH 7,5, 50 mg /mL de lysozyme) puis incubés à 37°C pendant 1 heure. Une quantité de SDS de concentration finale de 1% avec 30 µg de Proteinase K et 25 µg d'ARNase a été ajoutée. Le lysat obtenu a été incubé à 55 °C pendant 2 h sous une agitation douce. Puis un volume de 500 µl de NaCl à 1,4 M a été ajouté, ensuite l'ADN a été extrait et déprotéiné en ajoutant 1 volume de phénol-chloroforme (1:1, pH: 08) par centrifugation à 10000 x g/ pendant 10 min. L'ADN précipité a été obtenu en ajoutant 2 volumes d'éthanol glacé puis séché à l'air et dissout dans de l'eau distillée.

### **5.2.1.1. Vérification de l'extraction de l'ADN.**

La concentration d'ADN a été déterminée à l'aide d'un fluorimètre Qubit® (Invitrogen), selon les instructions du fabricant.

### **5.2.1.2. Séquençage de génome total des deux isolats D2 et MS1**

Le séquençage complet du génome a été réalisé par la Technologie Novogène de Bioinformatiques Co. L.t.d. (Hong Kong) à l'aide de la plate-forme HiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA) avec une approche à deux extrémités appariées de 2x250 pb. Les lectures ont été assemblées à l'aide de SPAdes version 3.10.0 (**Bankevich et al. 2012**).

#### **a) Isolat D2**

La séquence génomique entière de la souche D2 productrice d'antibiotique a été obtenue en utilisant une plate-forme Illumina HiSeq au moyen d'une approche à deux extrémités de 250 pb (type de séquençage qui génère une paire de séquences (lectures) séparées par une distance connue). Au total, 5107562 lectures (cadres de lectures ouverts, ORF) ont été obtenues et assemblées en 159 contigs (300-555435 pb de taille), avec une longueur totale de 7986415 pb, un N50 de 318,627 pb et un L50 de 10 (couverture brut du génome environ de X 160). Le contenu de GC était d'environ 72%.

La comparaison du génome assemblé de l'isolat D2 avec les séquences du génome entier des espèces appartenant au genre *Streptomyces* disponible dans les bases de données GeneBank (NCBI) a montré, un taux d'identité nucléotidique élevé (90% sur un taux de couverture 76%) avec la souche *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 (numéro d'accession GenBank CP012382.1). Cette souche semble la plus proche génétiquement à notre souche et, avec une similarité 91% avec la souche *Streptomyces pactum* ACT12 (numéro d'accession Genbank CP019724.1) (taux de couverture 79%). Cette identité relativement faible suggère que la D2 pourrait appartenir à une nouvelle espèce de *Streptomyces*. Cette hypothèse a été confirmée en calculant l'ANIB et par la méthode GGDC.

Le génome entier de la souche D2 a été comparé en utilisant ANIB et la méthode GGDC avec les séquences génomiques de ses homologues les plus proches, *S. ambofaciens* ATCC23877 et *Streptomyces pactum* ACT12 et celle de *Streptomyces spp*, souches sélectionnées en fonction de l'identité de séquence évaluée à l'aide de l'outil en ligne BLAST. La séquence du génome entier de la souche D2 a été également comparée à celle de : *Streptomyces lividans* TK24 (GenBank CP009124.1), *Streptomyces cyaneoegriseus* subsp. *noncyanogenus* NMWT 1(CP010849.1), *Streptomyces glaucescens* GLA.O (CP009438.1), *Streptomyces luteus* TRM 45540 (JNFQ01000001.1), *Streptomyces parvulus* 2297 (CP015866.1) et *Streptomyces coelicolor* A 3 (AL939114.1).

La souche D2 a montré une ANIb identique avec toutes les souches sélectionnées (82-87%), montrant les valeurs les plus élevées avec la souche *S. ambofaciens* ATCC 23877 et la souche *S. pactum* ACT12 (87%). L'identité globale était toujours inférieure à 94% -96%, la valeur seuil actuellement acceptée pour l'identification des espèces (**Richter et Rosselló-Móra 2009**). La distance génome-génome a été calculée à l'aide de la méthode GGDC (Genom génome distance comparaison) qui simule *in silico* la technique d'hybridation ADN-ADN (DDH). La similarité *in silico* DDH entre D2 et les *Streptomyces* spp. sélectionnées à des fins de comparaison est toujours inférieur à la valeur seuil de 70% qui indique la limite de l'espèce (intervalle de 27% à 38%). Les valeurs de DDH les plus élevées ont été observées, comme prévu et conformément aux résultats de l'analyse ANIb, avec *S. ambofaciens* ATCC 23877 et *S. pactum* ACT12 (37% et 38% respectivement). Alors que les valeurs DDH les plus faibles ont été observées avec les souches de *noncyanogenus* NMBT 1 et *Streptomyces glaucescens* GLA.O (30% et 27% respectivement). Tenant compte de ces résultats, nous pouvons supposer que la souche *Streptomyces* spp (D2) correspond à une nouvelle espèce de *Streptomyces*.

### **b) Isolat MS1**

La séquence génomique entière de la souche MS1 a été obtenue en utilisant une plate-forme Illumina HiSeq au moyen d'une approche à deux extrémités de 250 pb (type de séquençage qui génère une paire de séquences (lectures) séparées par une distance connue, 5,732,580 lectures ont été obtenues et assemblées en 38 contigues (de taille 400 - 1, 530,988 pb), avec une longueur totale de 8 180 953 pb, N50 de 692 752 pb et un L50 de 4. Le pourcentage GC était d'environ 71%. La Comparaison des scafolds assemblés du génome MS1 avec le génome entier du genre *Streptomyces* disponible dans la base des données publiques ont montré un taux d'identité nucléotidique élevé (99%) avec la souche *Streptomyces cyaneofuscatus* NRRL B-2570 (**GenBank JOEM01000000.1**). L'identification et l'appartenance de MS1 à l'espèce *S. cyaneofuscatus* était confirmée en calculant l'ANIb par la méthode GGDC. Le génome entier MS1 a été comparé aux séquences du génome de son homologue le plus proche, la souche *S. cyaneofuscatus* NRRL B-2570, et des souches représentatives de *Streptomyces griseus*, y compris la souche *S. luridiscabie* NRRL B-24455 (GenBank. LIQV01000000.1) et *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 (GenBank AP009493.1), et avec des espèces voisines la plus éloignée *Streptomyces* spp. (*S. albus* subsp. *Albus* NRRL B-16041(GenBank JNWW01000000.1)).

L'ANIb le plus élevé a été observé avec la souche *S. cyaneofuscatus* NRRL B-2570 (99,4%), tandis que l'identité avec les autres souches restantes était globalement inférieure

(entre 86% - 91%), mais toujours inférieure à 94% - 96% valeur limite actuellement acceptée pour l'identification des espèces (**Richter et Rosselló-Móra 2009**) en 2014 kim et ses collaborateurs ont limité cette valeur à 98,65. La distance entre génome-à-génome a été calculée au moyen de la méthode GGDC, qui est simulée *in silico* l'ADN-ADN par la Technique d'hybridation (DDH) ; La similarité *in silico* DDH entre MS1 et *S. cyaneofuscatus* NRRL B- 2570 a été estimée à 95,7% alors que la similarité de MS1 avec les génomes testés restants était toujours sous la valeur de limite 70% et qui indique la limite de l'espèce (gamme de 33% à 66,3%). Enfin, les caractéristiques génomiques et les résultats du blast initial des génomes ainsi que l'analyse de similarité par GGDC et par ANI pour les deux souches D2 et MS1 sont récapitulés dans les Tableaux **36, 37 et 38**.

**Tableau 36 :** Caractéristiques génomiques des deux souches D2 et MS1

Caractéristiques génomiques	Souches	
	D2	MS1
Numéro d'accession du génome	En cours	MF288894
Taille du génome	7, 986,415 bp	8, 180,953 bp
Nombre de contigües	159	38
Taux de couverture du séquençage	79%	98%
N50	318,627 bp	692,752 bp
Taux de GC	72%.	71%

**Tableau 37 :** Résultat du blast initial des génomes des deux souches D2 et MS1

caractéristiques	Souches		
	D2	MS1	
Souche type la plus proche	<i>Souche de Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	<i>Souche de Streptomyces pactum</i> ACT12	<i>Souche de Streptomyces cyaneofuscatus</i> NRRL B-2570
Taux de couverture	79%	79%	/
Taux de similarité	90%	91%	99%
Numéro d'accession	CP012382.1	CP019724.1	<b>JOEM01000000.1</b>

**Tableau 38 :** Résultats de l'analyse de similarité par GGDC et par ANI pour la souche D2 et MS1.

Les souches les plus proches de la souche D2	Valeurs ANI	Valeurs GGDC
<i>S. ambofaciens</i> strain ATCC 23877	(87%)	37%
<i>Streptomyces pactum</i> strain ACT12	(87%)	38%
Les souches les plus proches de la souche MS1	Valeurs ANI	Valeurs GGDC
<i>Souche de Streptomyces cyaneofuscatus</i> NRRL B-2570 (GenBank accession no. <u>JOEM01000000.1</u> )	99,4%	95,7%

### **Discussion générale**

Le présent travail nous a permis d'isoler 32 isolats d'actinobactéries à partir de 06 échantillons du sol provenant de différentes régions d'Algérie. La majorité de ces isolats appartiennent au genre *Streptomyces* qui semble être le plus prédominant par rapport aux autres genres. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par de nombreux auteurs (**Elwan et al., 1985; Sabaou et al., 1998; Peela et al., 2005; Vijayakumar et al., 2007**).

L'activité antibiotique de ces isolats a été testée par deux méthodes (cylindre d'agar et stries croisés). Il en ressort que la méthode la plus efficace et la plus précise était la méthode de cylindre d'agar. Nous avions choisi à la lumière de ces résultats quatre (04) meilleurs isolats présentant une importante activité antibiotique.

Nous avons remarqué aussi que la plupart des isolats présentent une bonne activité antibactérienne par rapport à l'activité antifongique. Cette activité est dirigée surtout contre les bactéries à Gram positif et les champignons. De nombreux travaux ont montré que certaines espèces de bactéries appartenant aux genres rares tels que *Saccharotrix*, *Nonomuraea*, *Nocardiopsi* et *Streptosporangium* présentent une activité intense vis-à-vis des bactéries Gram positif, en revanche leur activité contre des bactéries Gram négatif et des champignons s'est révélée moins importante (**Zitouni, 2003 ; Lamari, 2006 ; Badji, 2006 ; Boudjella, 2007**). Néanmoins, l'activité des quatre souches sélectionnées (MS1, 10, C et D<sub>2</sub>) est très importante aussi bien contre les bactéries que contre les champignons. Les souches MS1, C et 10 possèdent une activité antifongique vis-à-vis des 03 souches de champignons phytopathogènes, la souche D<sub>2</sub> est la plus efficace contre les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*).

D'après la littérature, le genre *Streptomyces* est parmi les germes les plus producteurs d'antibiotiques (**Jensen et al., 1991; Hassan et al., 2011**). 70% des antibiotiques commercialisés sont sécrétés par ce genre (**Perry, 2004**). Cette biodiversité des antibiotiques a été signalé par des nombreux auteurs (**Staufenberger et al., 2008 ; Wiese et al., 2009**). D'autres souches appartenant aux genres rares (*Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Saccharomonospora*, *Streptosporangium* et *Nocardiopsis*) se sont également révélées productrices d'antibiotiques, mais leur pouvoir antagoniste est moins important que celui des souches rattachées au genre *Streptomyces*. La mise en évidence de l'activité antibiotique contre les souches multi résistantes a confirmé l'activité très remarquable de la souche (D<sub>2</sub>) appartenant au genre *Streptomyces*.

La production d'antibiotiques par la souche D<sub>2</sub> a été importante sur le milieu complexe ISP2, connu pour être parmi les plus favorables à la production d'antibiotiques

(**Zitouni, 2005 ; Badji, 2006 ; Lamari, 2006 ; Boudjella, 2007 ; Toumatia, 2010 ; Driche, 2010**). Selon **Larpent et Sanglier, 1989**, une source de carbone rapidement assimilable par la plupart des micro-organismes producteurs d'antibiotiques, exerce une action négative sur la production de ceux-ci. Cet effet est appelé : répression catabolique glucidique ou « effet glucose ». Ainsi, le glucose à certaines concentrations peut réprimer la sécrétion de l'actinomycine, de la bacitracine, de la céphalosporine C, du chloramphénicol, de la kanamycine et de la pénicilline (**Chorin. 2009**).

Cependant, il est difficile de proposer une explication rationnelle aux différences observées au niveau de la production en raison de la complexité des milieux utilisés. Le fait de noter une diminution et/ou une absence d'une activité dans un milieu ne signifie pas que la souche en question soit incapable d'utiliser les différents substrats. Il pourrait s'agir de non-synthèse de précurseurs, d'inhibition d'enzymes ou du pH du milieu (**Delaunay et al., 2003**). Cette inhibition est due à l'acidification suite à l'accumulation des acides organiques (**Strub, 2008**). L'amidon, le nitrate et certains acides aminés (comme la valine) sont des stimulateurs de la production de plusieurs métabolites secondaires (**Awad, 2005**). Il a été signalé que les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et le temps d'incubation influent sur la production des antibiotiques par les actinobactéries (**Iwai et al., 1973**).

En général, les micro-organismes produisent des métabolites secondaires durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinobactéries, cette production peut avoir lieu pendant les phases exponentielle, stationnaire et de déclin (**Zitouni, 2005 ; Badji, 2006**). Durant les phases de déclin, les cellules se lysent et libèrent des quantités d'antibiotiques non encore sécrétés.

Les résultats de l'antibiographie ont montré que l'extrait de la phase aqueuse de la D2 était peu actif, cela nous a permis de tester les extraits de la phase organique. Ces derniers ont été retenus suite une importante activité. L'utilisation de plusieurs solvants d'extraction a été très utile en raison des différents résultats obtenus. Selon les caractéristiques physico-chimiques, les antibiotiques peuvent être extractibles par un solvant tout en étant insolubles dans un autre solvant de polarité différente (**Badji, 2006**). Pour la souche D2, l'acétate d'éthyle s'est révélé le meilleur solvant d'extraction car l'extrait obtenu a montré une importante activité. Le diamètre d'inhibition est de 30 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ce même extrait s'est révélé inactif vis-à-vis des espèces fongiques. Cette importante activité de l'isolat D2 laisse supposer une production d'un antibiotique hydrophobe de nature non polyénique. Ce résultat nous a incités à poursuivre des recherches sur cet isolat, en s'intéressant sur le produit bioactif qu'il sécrète. Ce résultat semble être

intéressant car les molécules polyéniques sont indésirables dans les programmes de recherche de nouvelles molécules antifongiques en raison des problèmes liés à leur toxicité, à leur instabilité et à leur mauvaise solubilité dans l'eau (**Drouhet et al., 1987; Gupte et al., 2002**).

La détection d'antibiotique par bio autographie de l'extrait de la phase organique a révélé la présence de taches actives pour la souche D2 dirigés contre les bactéries Gram positive. L'activité des filtrats obtenus avec le milieu ISP2 est uniquement dirigée contre les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* MDR et *Bacillus subtilis*).

L'étude macro et micromorphologique réalisée pour les trois souches est suffisante pour confirmer l'appartenance de ces souches au genre *Streptomyces*. La morphologie de ce genre est particulière avec des colonies irrégulières de surface pulvérulente grandes et colorées. Les mycéliums aérien et du substrat sont très évolués, complexes et persistants. Les hyphes du mycélium aérien sont constitués par de longues chaînes de spores (3 à 50) droites ou flexueuses. Le mycélium du substrat est stérile et ne se fragmente pas (**Manuel de Bergey, 1994, 2012**). Ces données restent insuffisantes pour aboutir à l'identification des espèces car le genre *Streptomyces* regroupe environ 500 espèces. Alors, pour affiner son identification, il est souhaitable d'effectuer plusieurs tests biochimiques (métabolisme des glucides, production d'antibiotiques, synthèse de mélanine, réduction du nitrate, hydrolyse de l'urée et de l'acide hippurique,...) ainsi que l'étude chimio taxonomique de la paroi cellulaire (**Prescott, 2002**).

L'identification moléculaire, nous a permis de confirmer l'appartenance de nos isolats au genre *Streptomyces* qui est le genre le plus abondant dans les échantillons telluriques, aussi bien de rattacher les deux isolats D2 producteur d'antibiotique au *Streptomyces ambofaciens* avec une probabilité d'être une nouvelle espèces et l'isolat MS1 à l'espèce *S. cyaneofuscatus* producteur d'enzyme (tyrosinase).

# **Conclusion et perspectives**

### Conclusion et Perspectives

La résistance microbienne aux molécules synthétiques constitue un problème important lorsqu'elle concerne des micro-organismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un micro-organisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeute pour lequel il est normalement sensible ; la propagation de ces bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure. Face à une demande croissante pour des alternatives à l'utilisation des antibiotiques, les efforts de la recherche se sont orientés vers les molécules ayant un plus grand spectre d'action sur différents types d'agents pathogènes.

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressif pour l'hôte semble toujours indispensable. Les actinobactéries sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers des quelque milliers d'antibiotiques isolés sont produits par les actinobactéries.

L'objectif de ce travail a été le criblage de souches d'actinobactéries à activité antibactérienne et antifongique à partir d'une collection d'isolats. Nous avons procédé à l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité biologique des souches sur des micro-organismes pathogènes par deux méthodes (stries croisés et cylindre d'agar) ainsi que la méthode de diffusion sur agar.

Après isolement et purification, les résultats des caractéristiques phénotypiques, physiologiques, biochimiques et génotypiques des bactéries obtenues confirment que les actinobactéries isolées de différents échantillons de sols appartiennent au genre *Streptomyces*. Nous avons ensuite réalisé un screening des isolats d'actinobactéries à potentialité antimicrobienne. L'activité antimicrobienne élevée de nos isolats sélectionnés confirme les résultats de nombreux travaux indiquant l'action antagoniste des actinobactéries contre les germes pathogènes résistants aux antibiotiques (**Kitoun, 2007**). Néanmoins, des études plus approfondies portant sur la caractérisation de l'activité antimicrobienne de ces isolats par d'autres techniques doivent être entreprise pour leur utilisation.

L'extraction et la purification de la molécule active à partir de la souche D2 a permis l'obtention d'une quantité purifiée insuffisante pour une analyse complète de la RMN, cela est probablement due à des aléas (problèmes) méthodologiques souvent difficile à résoudre.

Les résultats obtenus à partir de la base des données Streptome DB, ainsi que la spectrométrie de masse à haute résolution (qui a permis de déterminer la masse et la formule brute de la molécule) ont permis le rapprochement de ce composé à deux molécules biosynthétiques produites par les *Streptomyces*, avec cependant certaines différences. Il s'agit de 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3-(4-métilpentanoil) de phénanthrène-9,10-dione et Galvaquinone A. L'analyse de spectre UV et infra rouge et RMN sont en cours afin de confirmer cette hypothèse.

Toutefois, cette étude est le point de départ pour approfondir et caractériser les propriétés des actinobactéries ayant des capacités antimicrobiennes ; de plus, ces informations pourraient être utilisées dans l'élaboration d'un programme de recherche afin d'identifier et de sélectionner des isolats performants à des fins thérapeutiques. L'industrie des antibiotiques a fait des progrès importants. Cependant, un nombre restreint d'actinobactéries a jusqu'alors été exploité. Il est probable que d'autres espèces d'actinobactéries pourront ultérieurement être exploitées et valorisées avec profit dans un domaine en pleine expansion, dont les retombées sont importantes dans le secteur pharmaceutique. D'ailleurs, il existe des découvertes récentes sur ces espèces de bactérie, compte tenu de leur intérêt économique, qui sont encore couvertes par le secret industriel et ne donnent pas lieu à publication.

Le travail réalisé dans cette présente étude s'est heurté aux limites de l'échantillonnage (échantillonnage de sol et nombre d'isolats). Sans doute pour obtenir des résultats meilleurs, il aurait fallu multiplier les sites d'isolement et d'expérimenter d'autres milieux sélectifs afin d'obtenir une collection assez importante

Il sera donc nécessaire ultérieurement de développer des protocoles de recherche se focalisant sur les interactions actinobactéries - souches pathogènes indicatrices afin de sélectionner des isolats plus performants. Dans une deuxième phase de travail, il serait souhaitable de choisir un protocole adéquat d'extraction et de purification du principe actif. Donc, de nombreuses études restent à faire si l'on veut évaluer rigoureusement des actinobactéries à intérêt thérapeutique.

Compte tenu de nos résultats, plusieurs perspectives peuvent être proposées.

- Au terme de ce travail, nous envisageons de continuer nos recherches sur certains axes pertinents relatifs aux micro-organismes du sol et qui méritent d'être étudiés.
- Isolement et sélection des souches bactériennes performantes à partir des écosystèmes originaux plus ou moins hostiles (milieu salin, milieux extrêmes...).

- Sélection des bactéries productrices de peptides antimicrobiens. Ces peptides seront isolés et caractérisés structuralement.
- Tests d'activité antimicrobienne des peptides isolés à partir des souches sélectionnées. Réalisation des tests de toxicité des antibiotiques sécrétés par les souches d'actinobactéries vis-à-vis des cellules animales, afin de mieux évaluer leur intérêt.
- Poursuite des études sur les souches MS1, C et 10 en s'intéressant à leurs métabolites secondaires et valider l'intérêt des espèces bactériennes par des analyses plus approfondies.
- Optimisation de la production des antibiotiques sur milieu liquide par la recherche des conditions optimales (sources carbonées, azotées, éléments minéraux, aération, pH).
- Pour une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction : actinobactéries – bactéries indicatrices, on peut envisager :
  - d'étudier la distribution de ces espèces dans différents écosystèmes.
  - réaliser de nouveaux tests *in vitro* et *in vivo* avec une quantité plus élevée d'extrait.

Au final, si ce travail de thèse reste une contribution à la caractérisation des actinobactéries à caractères thérapeutiques, il ouvre de nombreuses perspectives en cours de concrétisation par la mise en place de nouveaux travaux sur les enzymes telle que les tyrosinases. Ces dernières peuvent jouer un rôle important dans diverses applications, y compris la production de nouvelles mélаниnes mélangées avec d'autres composés protéiques, la réticulation de protéines, les Biosensors phénolique, production de L-DOPA dans les industries pharmaceutiques, la désintoxication des eaux usées contenant des phénols et l'élimination des colorants (**Faccio et al., 2012**). Enfin, l'ensemble des résultats obtenus nous permet d'être optimistes quant à la possibilité de continuer sur l'actinobactérie MS1 et d'orienter notre travail de recherche sur la tyrosinase bactérienne. D'ailleurs, cette nouvelle piste de recherche a déjà fait l'objet d'une publication scientifique (**Harir et al., 2017**).

# Références Bibliographiques

**A**

- Abbas I. H. (2006). Biological and Biochemical Studies of actinomycetes isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait. *Journal of applied sciences research*, 2 (10), 809-815.
- Abdelaziz W. (2006). isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Mémoire de Magister, spécialité:Microbiologie et Biochimie Appliquées. Université Mentouri, Constantine, p100.
- Abnizova I., Leonard S., Skelly T., Brown A., Jackson D., Gourtovata M., Qi G., Te Boekhorst R., Faruque N., Lewis K. and Cox, T. (2012). Anlysis of context dependent errors for Illumina sequencing. *Journal of bioinformatics and Computational biology*,10 (02), 124-1005.
- Adegboye M. and F et Babalola O.O. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes *African Journal of Agricultural Research*,7(15), 2255-2261.
- Adekambi T., Drancourt M.,& Raoult D. (2009). The rpoB gene as a toolfor clinical microbiologists. Trends Microbiol, 17(1), 37-45.
- Aghighi, S., Shahidi Bonjar, G. H., Rawashdeh, R., Batayneh, S., & Saadoun, I. (2004). First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(4), 463-471.6.
- Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P.(2016). An Introduction to Actinobacteria. In: Dhanasekaran D., Jiang Y. (eds) Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications. Intech, Rijeka, Pp. 3-37.
- Antoun H., Bordeleau L.M., Gagnon., Lachanger R.A (1978). Actinomycétes antagonistes de champignons et n ‘affectant pas le *Rhizobium meliloti*. Canadian journal of Microbiology 24,558-562.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and lipman D.J. (1990). Basic local alignement search tool. *The Journal of Molecular Biology*.5; 215(3):403-410.
- Anderson A.S., Wellington E.M. (2001).The taxonomy of *Streptomyces* and related genera.Int International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(3), 797–814.

**Andriambololona T.** (2010). Etude biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafoibe. Thèse de doctorat. UNIVERSITE D'ANTANANARIVO, Pp. 5-10.

**Aouiche A., Bijani C., Zitouni A., Mathieu F., Sabaou N.** (2014).Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* sp. PAL114.isolated from Saharan soil. *Journal of Medical Mycology*, 24(2), 17–24.

**Aouiche A.,Bouras N., Mokrane S., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP.** (2015).*Actinokineospora mzabensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107 (1), 291–296.

**Ara I., Bukhari NA., Wijayanti D.R. and Bakir M.A.** (2012). Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3849-3857.

**Arifuzzaman M., Khatun M.R. and Rahman H.** (2010). Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activeity. *African Journal of Biotechnology*, 9(29), 4615-4619.

**Austin, M. B., & Noel, J. P.** (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural product reports*, 20(1), 79-110.

**Awad H., M.,El-ShahedK.Y. L., et El-Nakkadi A.M.** (2009). Isolation, screening and identification of newly isolated soil *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. NRC-35) for B- lacatamase inhibition production. IDOSI Publication, 7(5), pp 637-646.

**Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D.,Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Reich C., StevensR., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O., (2008).**The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, (9), pp1471-2164-9-75.

**Rapport-gratuit.com** 

## **B**

**Bacha N.** (2009). Caractérisation des polycetones synthases intervenant dans la biosynthèse d'ochratoxine A, d'acide penicillique, d'asperlactone et d'isoasperlactone chez *Aspergilluswesterdijkiae*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 236 p.

- Badji B., (2005). Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxinogènes. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 15(4), 211-219.
- Badji B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de doctorat en Microbiologie, Université de Mouloud Mammeri, Tizi ouzou Algerie. p226.
- 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.(4), 373–382.
- Badji B., Mostafaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E., Tillequin F. (2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , 34(6). 403–412.
- Bankevich A., NurkS., Antipov D., Gurevich A.A., DvorkinM., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotnik A.V., Vyahhi N., TeslerG., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. (2012).SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5) 455-477.
- BaskaranR., Vijayakumar R. & Mohan P. M. (2011).Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(1),26-32.
- Baranasic, D., Gacesa, R., Starcevic, A., Zucko, J., Blažič, M., Horvat, M., Cullum, J. (2013). Draft genome sequence of *Streptomyces rapamycinicus* strain NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin. *Genome announcements*, 1(4), e00581-13.
- Basilio A., GonzálezI., Vicente M.F., Gorrochategui J., Gabello A., González A., Genilloud O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4). 814–823.
- Bastide A., De Méo M., Andriantsoa M., Laget M. et Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non polyéniques. *MIRCEN J Appl Microbiol Biotechnol*, 2(4). 453–466.
- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E., Lechevalier H.A. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Applied Microbiology*, 12(5). 421–423.
- 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 medicale*, 26(2), 160-169.

- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147.
- Berdy J., Aszalos A., and McNitt K.L. (1987). Handbook of antibiotic compounds. XIII. Vols. 1, 2, 3. Microbial metabolites. CRC Press, Boca Raton, Fla. Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58, 1–26. doi: 10.1038/ja.2005.1.
- Bernan V., Filpula D., Herber W., Bibb M., Katz E. (1985) .The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. *Gene*, 37(1) 101-110.
- Betina, V. (1973). Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *Journal of Chromatography A*, 78(1), 41-51.
- Bignell, G. R., Greenman, C. D., Davies, H., Butler, A. P., Edkins, S., Andrews, J. M., & Widaa, S. (2010). Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature*, 463(7283), 893.
- Bickerton G.R., Paolini G.V., Besnard J., Muresan S., Hopkins A.L. (2012). Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature. Chemistry*, 4(2) 90-98.
- Bizzini A.,&Greub G.(2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *ClinicalMicrobiology and Infection*, 16(11)1614- 1619.
- Bizzini A., Jaton K., Romo D., Bille J., Prod'hom G.,& Greub G. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *Journal of Clinical Microbiology*,49 (2). 693-696.
- Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiological research*, 168(4), 223-230.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H. P., and Sabaou N. (2013). *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *InternationalJournal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,63(10) 549–553.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013b). *Saccharothrix saharensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3744–3749.

- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2015). *Saccharothrix tamanrassensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65(4). 1316–1320.
- Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P. (2005). Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. Journal de Mycologie Médicale, 15(1). 39–44.
- Boudemagh A. (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat, spécialité : Microbiologie Appliquée. Université Mentouri, Constantine, p62.
- Boudjella H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach (Alger). p177.
- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., et Sabaou N. (2007). Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (1). 1364–5072.
- Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N., Lebrihi A. (2010). Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *J Antibiotics*, 63 (12), 709–711.
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Zerizer, H., & Boulahrouf, A. (2012, March). Antibacterial activity of rare *Streptomyces* species against clinical resistant bacteria. In Annales de biologie clinique 70 (2), pp. 169-174.
- Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. Microbiological research, 168(4), 223-230.
- Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2008). Precursor directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Process Biochemistry, 43(11), 1244–1252.
- Bouras N., Meklat Toumatia O., Mokrane S., Holtz D.M., Strelkov E., Stephen Sabaou N. (2013). Bioactive potential of a new strain of *Streptomyces* sp. PP14 isolated from Canadian soil, African Journal of Microbiology Research, 7 (25), 3199-3208.

- Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk H.P.(2015).*Nocardiopsis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(2).313–320.
- Bradford M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal of Biochemistry*, 72(1-2). 248-254.
- Braña A.F., Fiedler H.P., Nava H., González V., Sarmiento-Vizcaíno A., MolinaA., Acuña J.L., GarcíaL.A., Blanco G. (2015). Two *Streptomyces* species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central Cantabrian Sea. *Microbial Ecology*, 69(3).512-524.
- Bryson, K., Loux, V., Bossy, R., Nicolas, P., Chaillou, S., Van De Guchte, M., . & Gibrat, J. F. (2006). AGMIAL: implementing an annotation strategy for prokaryote genomes as a distributed system. *Nucleic acids research*, 34(12), 3533-3545.
- Bull, A. T., Stach, J. E., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2005). Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(1), 65-79.
- C**
- Cao C. M., Chen, M., & Wong, T. M. (2005). The KCa channel as a trigger for the cardioprotection induced by kappa-opioid receptor stimulation—Its relationship with protein kinase C. *British journal of pharmacology*, 145(7), 984-991.
- Chater K.E., Hopwood D.A. (1973). Differentiation in actinomycetes. In: J. M. Ashworth and J. E. Smith (Eds.) *Microbial Differentiation*. Cambridge University Press. London. P. 143-160.
- Chen J, Li Y, He M, Yan B, Meng X. Complete mitochondrial genome of the spotted scat *Scatophagus argus* (Teleostei, Scatophagidae). *Mitochondrial DNA*. 2015 Apr;26(2):325-6.
- Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., FrancoisP. & Schrenzel J. (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *Journal of Clinical Microbiology* , 48, 1169-1175.
- Choulet F. (2006).Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy,1, Pp 210.
- Chun J., Seang C.N., Lee K. J., Kang S.A., Goodfellow M. et HahV.C. (1998).*Nocardia flavorosea* sp. Nov. *International Journal of Systimatic Bacteriology*, 48(3), 901–905.

- Chorin, A. C., Bijeire, L., Monje, M. C., Baziard, G., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2009). Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithioliopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *Journal of applied microbiology*, 107(5), 1751-1762.
- Clarridge J. E. III (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17, 840-862.
- Claus, G., & Kutzner, H. J. (1985). Autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans* in a packed bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 289-296.
- Coenye T., GeversD., Van de Peer Y., Vandamme P.,& Swings J. (2005).Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 147-167.
- Cohn en (1875) Cohn F. (1972). Genus *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.Williams and Wilkins, Baltimore.Pp. 1105-1139.
- Colombié V. (2005).Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, p174.
- ConnK. L. (2005). Volatile fatty acids in liquid swine manure are toxic to *Verticillium dahliae* in low pH soils. (Abstr.) Proc. Eighth International Congres of Plant Pathology,2,273.
- Costello M., Pugh T.J.,FennellT.J, Stewart C.,Lichtenstein L., Meldrim J.C., Fostel J.L., Friedrich D.C., Perrin D., Dionne D., KimS.,GabrielS.B., Lander E.S., FisherS. and Getz G.(2013). Discovery and characterization of art factual mutation in deep coverage targeted capture sequencing data due to oxidation DNA damage sample preparation *Nucleic Acids Research*,41, 67.
- Chorin, A. J., & Hald, O. H. (2009). Stochastic tools in mathematics and science (Vol. 3). New York: Springer.
- Cundell D.R., Piechoski M.P.(2016). Potentially novel Actinobacteria derived antibiotic from unique microenvironments. In: Antimicrobials Synthetic and Natural Compounds. (Dhanasekaran et al. 2010, Eds), P.83-98, CRC Press, New York.
- D**
- Dancer S.J.(2004).How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(10), 611-619.

Danilenko V.N., Mironov V.A., Elizarov S.M. (2005). Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(4), 319–329.

Davis C, Kota K, Baldhandapani V, Gong W, Abubucker S, Becker E, Martin J, Wylie K.M, Khetani R, Hudson ME, Weinstock GM, Mitreva M. mBLAST: Keeping up with the sequencing explosion for (meta)genome analysis. *J Data Mining Genomics Proteomics*. 2015 Aug;4(3). pii: 135.

Davis N. K., and Chater K. F. (1990). Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3 involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Molecular Microbiology*, 4(2), 1679-1692.

De la Bastide, M., & McCombie, W. R. (2007). Assembling genomic DNA sequences with PHRAP. *Current Protocols in Bioinformatics*, 11-4.

Debananda S.N., Suchitra S. et Nimanchand S. (2009). Screening of Actinomycete Isolated from Niche Habitats in Manipur for Antibiotic Activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5(4), 221-225.

Decker H., Jaenicke E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins, *Developmental and Comparative Immunology*. 28 , 673–887.

De Jong, E., & Schappert, H. J. V. (1972). Calculation of soil respiration and activity from CO<sub>2</sub> profiles in the soil. *Soil Science*, 113(5), 328-333.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Lavoisier, Éditions Médicales Internationales, 476 p.

Delaunay F., ThisseC., ThisseB., and Laudet V. (2003). Differential regulation of Period 2 and Period 3 expression during development of the zebrafish circadian clock. *Gene Expression Patterns*, 3(3), 319-324.

Demain A.L., et Solomon N.A. (1985). Biology of industrial microorganisms. *Inc. Cummings publishing company*, 29 (6),135.

Demain, A. L., & Fang, A. (1995). Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetologica*, 9(2), 98-117.

Demain A.L. (2006).From natural products discovery to commercialization: a success story. *the Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*,33(7), 486–495.

- Demain A.L., Dykhuizen L.** (2006). Ecology and industrial microbiology. Editorial Overview. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 237-239.
- Dennis C., Webster J.** (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 5, 25–39.
- Devereux, R., He, S. H., Doyle, C. E. A., Orkland, S., Stahl, D. A., LeGall, J., & Whitman, W. B.** (1990). Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3609-3619.
- Djinni I.** (2009). Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia. Thèse de Magister, spécialité : Microbiologie Appliquée. Université A. Mira, Bejaia, p.46.
- Dhanasekaran D., Selvamani S., Panneerselvam A., and Thajuddin N.** (2009). Isolation and characterization of actinomycetes in Vellar Estuary, Annagkoil, Tamil Nadu. *African Journal of Biotechnology*, 8(17), 4159-4162.
- Dhanasekaran D., Thajuddin N., Panneerselvam A.** (2010). Herbicidal agents from actinomycetes against selected crop plants and weeds. *Natural Products Research*, 24(6), 521-529.
- Dhanasekaran D., Ambika K., Thajuddin N., Panneerselvam A.** (2012). Allelopathic effect of Actinobacterial isolates against selected weeds. *Archive Phytopathology Plant Protection*, 45(5), 505-521.
- Digal D.** (2003). Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactéritroires: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. Pp. 157.
- Drancourt M., Berger P.,& Raoult D.** (2004). Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2197-2202.
- Drancourt M.,& Raoult D.** (2005). Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 4311-4315.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B.** (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8817-8822.
- Driche E.H.** (2010). Recherche des Streptomyces actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister, spécialité : Microbiologie. Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, p.121.

- Driche E.H., 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*. *Annal of Microbiology*, 65,1341–1350.
- Drouhet, E., & Dupont, B. (1987). Evolution of antifungal agents: past, present, and future. *Reviews of infectious diseases*, 9(Supplement\_1), S4-S14.
- Duraipandian V., Sasi A.H., Islam V.I.H., Valanarasu M., Ignacimuthu S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal of Medical Mycology*, 20 (1), 15–20.

**E**

EcoAntibio 2017 : Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire.  
[http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/plan\\_ABR-171111.pdf](http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/plan_ABR-171111.pdf).

El-Nakeeb M., Lechevalier H. (1963). Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. *Applied Microbiology*, 11(2), 75-77.

Elwan S.H., Diab A., El Gounaim M.Y. (1985). Ecology of the streptomycetes flora in the desert soil of Kuwait. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, 99-104.

Ensign, J. C., Normand, P., Burden, J. P., & Yallop, C. A. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Research in Microbiology*, 144(8), 657-660.

Ensign, J. C., Normand, P., Burden, J. P., & Yallop, C. A. (1993). Physiology of some actinomycete genera. *Research in microbiology*, 144(8), 657-660.

El-Tarably, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1505-1520.

Eunice J.A., Prosser J. I. (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *Journal of genetic microbiology*, 129, 2029-2036.

Euzéby J.P. (2002). Les taxons bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 2001. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153(1), 5–14.

**F**

Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M., Thöny-Meyer, L., 2012. Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*. 47(12), 1749-1760.

Fedorco M., Romieu A., Williams S., Lawrence I., Turcatti G.(2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*. 2006 Feb 9-34(3):e22.

Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368–376.

Felsenstein J., Devereux R., He S.H., Doyle C.L. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783– 791.

Fiegler H., Redon R., Andrew D., Scott C., Andrew R., Carder C., Clar R., Dovey O., Ellis P., Feuk L., French L., Hunt P., Kalaitzopoulos D., Larkin J., Montgomery L., Perry G.H., Plumb B.W., Porter K., Rigby R.E., Rigler D., Valsesia A., Langford C., Humphray S.J., Scherer S.W., Lee C., Hurles M.E., and Carter N.P. (2006). Accurate and reliable high-throughput detection of copy number variation in the human genome, *Genome Research*, 16, 1566-1574.

Flatt P.M., Wu X., Perry S., and Mahmud T. (2013). Genetic insights into pyralomicin biosynthesis in *Nonomuraea spiralis* IMC A-0156. *Journal of Natural Products*, 76(5), 939–946. doi: 10.1021/np400159a Nakae *et al.*, 2013).

Flinspach, K., Westrich, L., Kaysser, L., Siebenberg, S., Gomez-Escribano, J. P., Bibb, M., & Heide, L. (2010). Heterologous expression of the biosynthetic gene clusters of coumermycin A1, clorobiocin and caprazamycins in genetically modified *Streptomyces coelicolor* strains. *Biopolymers*, 93(9), 823-832.

Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, Z. J., Ferradji, F. Z., Bejar, S., & Boutoumi, H. (2012). A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. strain AH4: Purification and biochemical characterization. *Bioresource technology*, 111, 383-390.

## G

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg (Eds). vol 4, p 401.

Gebreyohannes G., Moges F., Sahile S., and Raja N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana. Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecin*, 3, 426–435. Doi: 10.1016/S2221-1691(13)60092-1.

Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J., Vicente F. (2010). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology*, 38(3), 375-389

Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J., Vicente F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology*, 38, 375–389.

George M., Anjumol A., Mohamed Halta A.A. (2012). Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *African journal of Microbiology Research*, 6(10), 2265-2271.

Gerber, N. N., & Lechevalier, H. A. (1965). Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Applied microbiology*, 13(6), 935-938.

Geraldine M., SchofieldM., Schaal K.P. (1981). A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *Journal of General Microbiology*, 127(2), 237–259.

Getha K., Vikineswary S. (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of industrial Microbiology*, 28(6), 303-310.

Girard H., Rougieux R. (1967). Technique de microbiologie agricole. Ed. Dunod, Paris, France, 216 p.

Gottlieb D. (1973). General Consideration and implication of the Actinomycetales. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Edited by G. Sykes and F. A. Sk.

Goodfellow M., Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189–216.

Goodfellow M., Stalon L.J., Simpson K.E., and Minnikin D.E. (1990). Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *Journal of General Microbiology*, 136(1), 19 -36.

Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. *Actinobacteria* phyl.nov. In: Goodfellow *et al.*, (Editors). *Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria*, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. Pp. 1–28.

Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. *Actinobacteria* phyl.nov. In: Goodfellow *et al.*, (Editors). *Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria*, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. Pp. 1455–1616.

Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Suzuki K., Ludwig W., Withman W.B. (2012). *Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria* (2èmeEds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London.p. 2083.

Graf E., Schneider K., Nicholson G., Ströbele M., Jones A.L., Goodfellow M., Beil W., Süßmuth R.D., Fiedler H.P.J. (2007). Antibiotics (Tokyo), 60, 277-284.

Grigorova, R., & Norris, J. R. (1990). Methods in microbiology, Volume 22: Techniques in Microbial Ecology.

Grund E., and Kroppenstedt R.M. (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(1), 5–11.

Guo Y., Li J., Li C.I., Long J., Samuels D.C., and Shyr Y. (2012). The effect of strand bias in Illumina short read sequencing data. *BMC genomics*, 13(1), p.666.

Guo, X., Wang, D., Duan, W., Du, J., & Wang, X. (2010). Preparative isolation and purification of four flavonoids from the petals of *Nelumbo nucifera* by high-speed counter-current chromatography. *Phytochemical analysis*, 21(3), 268-272.

- Grüning BA, Erxleben A, Hählein A, Günther S. (2013 Jun). Draft Genome Sequence of *Streptomyces viridochromogenes* Strain Tu57, Producer of Avilamycin. *Genome Announc.* 20;1(3)
- Guo, Y. G., Hu, J. S., & Wan, L. J. (2008). Nanostructured materials for electrochemical energy conversion and storage devices. *Advanced Materials*, 20 (15), 2878-2887.
- Gupte M., Kulkarni P., Ganguli B.N. (2002). Antifungal antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (1), 46–57.
- Gustav Fischer-Verlag. Stuttgart, Germany, pp.137–144.Perry J. J., Staley J.T., Lory S. (2004). *Microbiologie*. Dunod, Pais, pp.497–498.
- Gurung T.D., Sherpa C., Agrawal V.P., et LekhakB. (2009). Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapathar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology*, 10, 173-182.
- H**
- Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., & Ladjama, A. (2014). Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt 29 isolated from poultry compost. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117 (4), 413-421.
- Harir Mohamed, Bellahcene Miloud, Fortas Zohra, José María García-Arenzana, Antonio Veloso, Susana Rodríguez-Couto. (2017). Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities. *International Journal Molecular and Cellular Medecin* Spring,6 (2) ,2 12.
- Harir Mohammed, Bellahcene Miloud, Baratto Maria Camilla, Pollini Simona, Rossolini Gian Maria, Trabalzini Lorenza, Fatarella Enrico, Pogni Rebecca (2017). Isolation and characterization of a novel tyrosinase produced by Sahara soil actinobacteria and immobilization on nylon nanofiber membranes. *Journal of Biotechnol.* (10);265:54-64.
- Hassan A.A., El-Barawy A.M., El Mokhtar., M.N.(2011). Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. *Journal of American science* , 7(4),752-760.
- Hayakawa M., Sadataka T., Kajiura T.,& Nonomura H. (1991). New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*,72, 320–326.
- Hayakawa M. (2012). *Actinoplanes rishiriensis* sp. nov., a novel motile actinomycete isolated by rehydration and centrifugation method. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 6 (5), 249-53.
- HeJ.,(2010).Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171. *Journal of Bacteriology*, 192(15), 4074–4075.

- Hilali H., Khattabi A., Nssarlah N., Malki A., et Finance C. (2002). Isolement de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2 (1),49-53.
- Hirsch, C. F., & Christensen, D. L. (1983). Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 46(4), 925-929.
- Hobbs G., Frazer C.M., Gardner D.C.J., Cullum J.A., Olivier S.G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 272–277.
- Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994). In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Hohmann C., Schneider K., Bruntner C., Brown R., Jones A.L., Goodfellow M., Krämer M., Imhoff J.F., Nicholson G., H.P., Fiedler & R.D., SüßmuthJ. (2009). Antibiotics, 62, 75-79.
- Hop D.V.,Sakiyama Y., Binh C.T.T., Otoguro M., Hang D.T., Miyadoh S., Luong D.T.,& Ando K. (2012). Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. *The Journal of Antibiotics*, 64(9), 599–606.
- Hopwood D.A.,and Wright H.M.(1973).A plasmid of *Streptomyces coelicolor* carrying a chromosomal locus and it sinter-specific transfer. *Journal of General Microbiology*,79,331 342.doi:10.1099/00221287-79-2-331.
- Huang Y., Cui Q., Wang L., Rodriguez C., Quintana E., Goodfellow M., Liu Z. (2004). *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. *Antonie van Leeuwenhoek* , (86), 159-165.
- Hiltner et stromer., 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(1), 81-91.
- Huang Z.M., Y.Z.,Zhang M. (2003).*Kotaki Compos. Sci. Technol*, 63, 2223–2253.
- Huttner A., Harbarth S., Carlet J., Cosgrove S., Goossens H., Holmes A., Jarlier V., Voss A., Pittet D. (2013). Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrobial Research Infection Control*, 2(1),1- 13.
- Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S. (2001). Isolation *In Vivo* and *In Vitro* of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology*, (67), 3739-3745.
- Hwang K.S., Kima H.U., Charusanti P., Palsson B.Ø., and Lee S.Y. (2014). Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites, *Biotechnology. Advance*, 32(2), 255–268.
- I**
- Ikram-ul-Haq Ali S., and Qadeer M.A.(2002).“Biosynthesis of l-DOPA by *Aspergillus oryzae*,” *Bioresource Technology*, 85 (1), 25–29.

- Ikeda, M., & Allen, C. N. (2003). Developmental changes in calbindin-D28k and calretinin expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 17 (5), 1111-1118.
- Inam-ul-Haq M., Javed N., Ahmad R., RehmanA. (2003). Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Pakistan Journal of Plant Pathology*, 2 (1), 65-74.
- Iwai Y., Awaya J., Kesado T., Yamada H., Omura S., Hata T. (1973). Selective fermentation of cerulenin by *Cephalosporin caeruleus*. *Journal of Fermentation Technology*, p.51-575.
- J**
- Janda J.M., & Abbott S.L. (2002). Bacterial identification for publication: when is enough enough? *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1887-1891.
- Janda J.M.,& Abbott S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Jankowitsch, F., Schwarz, J., Rückert, C., Gust, B., Szczepanowski, R., Blom, J., & Mack, M. (2012). Genome sequence of the bacterium *Streptomyces davawensis* JCM 4913 and heterologous production of the unique antibiotic roseoflavin. *Journal of bacteriology*, 194(24), 6818-6827).
- Jeffrey L.S.H. (2008).Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok,Sarawak, *African Journal of Biotechnology*, 7 (20), 3697-3702.
- Jensen P.R., Dwight R.Y., Fenical W. (1991).Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied Environment and Microbiology*, 57(4), 1102-1108.
- Johnsen, S. A., Subramaniam, M., Katagiri, T., Janknecht, R., & Spelsberg, T. C. (2002). Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGF $\beta$ /Smad signaling by TGF $\beta$  inducible early gene. *Journal of cellular biochemistry*, 87(2), 233-241.
- Jose P.A., Santhi V.S., Jebakumar S.R.D. (2011). Phylogenetic-affiliation, antimicrobial potential and PKS gene sequence analysis of moderately halophilic *Streptomyces* sp. inhabiting an Indian saltpan. *Journal Basic of Microbiology*,51(4), 348–356.
- Jukes T.H., Cantor C.R. (1969). Evolution o f protein molecules. In: Munro HN (Ed). *Mammalianprotein metabolism*, 3. Academic Press, New York. (3),21–132.
- K**
- Kang, M. J., Strap, J. L., & Crawford, D. L. (2010). Isolation and characterization of potent antifungal strains of the *Streptomyces violaceusniger* clade active against *Candida albicans*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(1), 35-41.
- Kämpfer P. (2006). The family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn, 3, Archaea, Bacteria, Firmicutes, Actinomycetes (edited by Dwor- kin, Falkow, Rosenberg, Schleifer and Stackebrandt). Springer, New York, Pp. 538–604.

- Katz L., Donadio S. (1993). Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. Annual Review of Microbiology, 47(1), 875–912.
- Kelly, K. L., & Judd, D. B. (1976). Color: universal language and dictionary of names (Vol. 440). US Department of Commerce, National Bureau of Standards.
- Khanna M., Solanki R., et Lal R.(2011). Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compound.*International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 2 (3), 357-375.
- Khaoua, S. (1990). Régulation des étapes initiales de la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*.
- Khosla C., Gokhale R.S., Jacobsen J.R., Cane D.E. (1999). Tolerance and specificity of polyketide synthases. Annual Review of Biochemistry, 68(1), 219–253.
- Kim C., Lee K., Kwon O., Yoo I. and Shimazu A. (1994). Selective isolation of actinomycetes by physical pretreatment of soil sample. Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 22, 222–225.
- Kim B., Al-Tai A.M., Kim S.B., Somasundaram P., Michael Goodfellow M. (2000). *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase producing Streptomyces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 505-509.
- Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., Goodfellow M. (2004). Taxonomic Study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil land description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (1), 211-214.
- Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. Chemical Engineering Science, 61(3), 1017-1026.
- Kim M., Oh H.S., Park S.C., and Chun J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 346-351.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H., Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north east of Algeria. *Journal of Medical Mycology*, 15(1), 45-51.
- Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie, P.170.

- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). Practical Streptomyces Genetics (The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom). *There is no corresponding record for this reference.*
- Kleinkauf et Doehren, 1996. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *The Journal of general and applied microbiology*, 49(3), 141–154.
- Klementz, D., Döring, K., Lucas, X., Telukunta, K. K., Erxleben, A., Deubel, D., & Günther, S. (2015). StreptomeDB 2.0—an extended resource of natural products produced by *Streptomyces*. *Nucleic acids research*, 44(D1), D509-D514.
- Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E., Goodfellow M. (1990). Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspera*. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(2),148–160.
- Kumar, D. S., Tony, D. E., Kumar, A. P., Kumar, K. A., Rao, D. B. S., & Nadendla, R. (2013). A review on *Abelmoschus esculentus* (Okra). *Int. Res J Pharm. App Sci*, 3(4), 129-132.
- Kutzner H.J. (1968). U" ber die Bildung von Huminstoffen durch Streptomyzeten, Landwirt. Forsch, 21, 48 61.
- L**
- Labeda, D. P., Goodfellow, M., Chun, J., Zhi, X. Y., & Li, W. J. (2011). Reassessment of the systematics of the suborder Pseudonocardineae: transfer of the genera within the family Actinosynnemataceae Labeda and Kroppenstedt 2000 emend.
- Labeda D.P., and Lechevalier M.P. (1989). Amendment of the genus *Saccharothrix* Labeda *et al.* 1984 and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *saccharothrixmutabilis* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39 (4), 420–423.
- Lacey, W. K. (1961). The tribunate of Curio. *Historia: Zeitschrift für Alte Geschichte*, (H. 3), 318-329.
- Lacey J. (1973).Actinomycetes in soils, composts and fodders. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series No. 7., 2, 231–51.
- Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E. et Tillequin F., (2002b). New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *Journal of Antibiotics*, 55(8), 702–707.
- Lamari L. (2006).Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, p.186.Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M. C., Dawyndt, P., & Swings, J. (2005). Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Research in microbiology*, 156(5-6), 755-762.

- Larpent J.P., Larpent-Gourgaud M. (1985). Éléments de Microbiologie. Hermann Paris, 264 p.
- Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989). Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris, 481 p.
- Larpent J.P., Larpent-Gourgaud M. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3<sup>ème</sup> Edition, Tech & doc., Lavoisier, 1039 p.
- Larpent, J. P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne: les principaux groupes bactériens. Tec & Doc.
- Latha S., Dhanasekaran D. (2013). Antibacterial and extracellular enzyme activities of gut Actinobacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* and *Capra hircus*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research., 5(11), 379-385,
- Latreille P., Norton S., Goldman B.S., Henkhaus J., Miller N., Barbazuk B., Bode H.B., Darby C., Du Z., Forst S., Gaudriault S., Goodner B., Goodrich-Blair H., and Slater S. "Optical mapping as a routine tool for bacterial genome sequence finishing," *BMC genomics*, 8(1), 321, Jan. 2007.
- Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. (1970). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds). G. Fisher Verlag, Jena, p. 393–405.
- Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. (1970b). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: Prauser H (Ed). *The Actinomycetales*. G Fisher Verlag, Jena, p. 393–405.
- Lechevalier M.P., De BievreC., LechevalierH.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. Biochemical systematics and ecology., 5, 249-260.
- Lechevalier H.A., and Lechevalier M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: *The prokaryotes*, Eds : Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows and H. G. Schlegel. Springer-Verlag. Berlin, 2, 1915-1922.
- Lee K.Y., and Mooney D.J. (2001)."Hydrogels for tissue engineering," *Chemical Reviews*, 101(7), 1869–1879.
- Lee J.Y., Hwang B.K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 48 (5), 407–417.
- Lee E.J., Hwang K.Y., Lee H.S., et Chung N.(2011). sp.A1022 as Potential Biocontrol Agent. journal of The Korean. Society for Applied Biological Chemistry, 54 (3), 488-493
- Lee J.Y., and Hwang B.K. (2002).Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Canadian Journal Microbiology, 48(5), 407–417.
- Lemriss S., Laurent F., CoubleA., Casoli E., LancelinJ.M., saintpierre-Bonaccio D., Rifali S., Fassouane A., Boiron P., (2003).Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. Canadian Journal Microbiology, 2003 Nov.,49(11),669-74.
- Le Roes-Hill, M., Palmer, Z., Rohland, J., Kirby, B.M., Burton, S.G., 2015. Partial purification and characterization of two actinomycete tyrosinases and their application in cross-linking reactions. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* (122), 353–364.

- Lichtman H., Watson J., Ginsberg V., Pierce J.V., Stokstad E.L., Jukes T.H. (1949). Vitamin B12b some properties and its therapeutic use. *Experimental Biology and Medicine.*, 72(3), 643-645.
- Ikeda, M., & Allen, C. N. (2003). Developmental changes in calbindin-D28k and calretinin expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 17(5), 1111-1118.
- Ilic, D., O'Connor, D., Green, S., & Wilt, T. (2007). Screening for prostate cancer: a Cochrane systematic review. *Cancer Causes & Control*, 18(3), 279-285.
- Lin C.F., Chen Z.Q., Xue Q.H., Lai H-X, Chen L.S., Zhang D.S. (2007). Nutrient contents and microbial populations of aeolian sandy soil in Sanjiangyuan region of Qinghai Province. *Chinese Journal of Applied Ecology.*, 18(1), 101-106.
- Lin Y.S., KieserH.M., Hopwood D.A., Chen C.W. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular Microbiology*, 10(5), 923–33.
- Lobel B.,& Soussy C. (2007). Les infections urinaires. Springer.<http://books.google.calbooks?id=N3pOjLWLOb sC>.
- Locci R.,and Sharples G.P. ( 1984). Morphology.In : “The biology of actinomycetes “.(Goodfellow M., Modarski M. and Williams S.T., Eds.), p. 165-199.Ac. Press. London.
- Locci R.,& Schofield G.M. (1989). Genus *Streptoverticillium* Baldacci 1958, 15,emend.mut.char. Baldacci, Farina and Locci., 1966,168 AL.In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 4, 2492-2504.Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J.G. Holt.Baltimore : Williams & Wilkins.
- Locci R. (1994).Actinomycetes as plant pathogens. *The European Journal of Plant Pathology* , 100(3-4), 179–200.
- Lopes A., Coelho R.R., Meirelles M.N.I., Branquinha M.H.,and Vermelho A.B. (1999). Extracellulaire serine-proteinase Isolated from *Strepomyces alboniger*.Partial Chracterization and effect of aprotinin on cellularstructure. *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*,94(6), 763-770.
- Loqman. S. (2009).La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse doc: Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie,p.253.

## **M**

- Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H. R., Schwämme, V., & Jensen, O. N. (2010). Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(7), 1423-1436.

- Marcone, V., Rocca, G., Lichtner, M., & Calzolari, E. (2010). Long-term vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* as a complementary approach to management of bacterial vaginosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 110(3), 223-226.
- Martin, T. E., Scott, J., & Menge, C. (2000). Nest predation increases with parental activity: separating nest site and parental activity effects. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1459), 2287-2293.
- Madigan, M. T., Martiko, J. M., & Parker, J. (1997). Antibiotics: isolation and characterization. Brook Biology of Microorganisms, 8th edn. Prentice-Hall International Inc. New Jersey, 440-442.
- Madigan M.T., et Martinko J.M. (2007). Brock Biologie des microorganismes. 11<sup>ème</sup> éditions, p. 396-398.
- Mane U.V., and Deshmukh A.M. (2009). Chitin degrading potential of three aquatic actinomycetes and its optimization. *African Journal Biotechnology*, 8(23), 6617–6620.
- Mann J. (2001). Natural products as immunosuppressive agents. *Nat Prod Rep*, 18, 417–430.
- Manteca A., Sanchez J. (2009). *Streptomyces* Development in Colonies and Soils, Applied and Environmental Microbiology, 75(9), 2920-2924.
- Marchal N., Bourdon J.L. (1973). Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Collection Biologie Appliquée. Doin, Paris, p.179.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
- Margalith P.L. (1992). Pigment microbiology. First edition Chapman et Hall, p. 5–15.
- Marino S.M., Fogal S., Bisaglia M., Moro S., Scartabelli G., De Gioia L., Spada A. Marmanne A, Marmann A.H., Aly W., Lin B., Wang P., Proksch. (2014). Co-cultivation—a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine Drugs*, 12, 1043-1065.
- Martin, P. (1992). Contribution à l'étude des systèmes différentiellement plats (Doctoral dissertation, École Nationale Supérieure des Mines de Paris).
- Mazodier J. (1974). Sociétés industrielles et déchets solides. *Sciences et Vie*, 106, 109-115. 205.
- McCormick J.R., Flärdh K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiology Reviews* 2012 Jan, 36(1), 206-31.
- McDaniel R.M., Thamchaipenet A., Gustafsson C., Fu H., Betlach M., Betlach M. and Ashley, G. (1999). Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel “un natural” natural products. , 96, 1846-1851.
- McKinney R.E. (2004). Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press : New York, p. 448.

- McNeil M.M., Brown J.M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews.* ., 7, 357–417.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Göker M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14, 1471-2105-14-60.
- Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Spröer C., and Klenk H.P. (2013). When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Archive of Microbiology*, 195, 413-418.
- Meklat A. (2012). Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'actinopolyspora. Thèse de Doctorat en sciences biologiques, spécialité: Microbiologie. Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Pp. 40- 48.
- Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckvoet U., Ramminger I., Iwen P., DunnJ., HallG., Wilson D., Lasala P., Kostrzewa M.,& Harmsen D. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 1946-1954.
- Merck E. (1975). Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt, p.149.
- Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N., Lebrihi A. (2010). Dithioliopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *Journal of Natural Products*, 73, 1164–1166.
- Messaoudi O. (2012). Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Bechar). These de doctorat 106 p.
- Metzker M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Natural Review of Genetic*;11(1):31-46. doi: 10.1038/nrg2626. Epub 2009 Dec 8. Review.
- Mignard, S. & Flandrois, J.P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of Microbiology Methods*, 67(3), 574-581.
- Miletic N.V., Abetz K.E., Bert K., Loos Macromol. RapidCommun. 31 (2010), 71–74.[6] J., Kim J.W., Grate P., Wang. *Chemical Engineering Science - Journal* ., 61 (2006), 1017–1026.
- Minnikin** D.E., O'Donnell A.G. (1984). Actinomycete envelope lipid and peptidoglycan composition. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Goodfellow M., Mordarski M. and Williams S. T. (Eds). Academic Press. London, p. 337–388.
- Minnikin D.E, PatelP.V., AlshamaonyL., and Goodfellow M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27, 104-117.
- Mituppatham C., Nithitanakul M., Supaphol P., Macromol. Chem. Phys., 205(2004), 2327.

- Monciardini P., Cavaletti L., Schumann P., Rohde M., et Donadio S. (2003). *Conexibacter Woeseli* gen sp. a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 53(2), 3–10.
- Moody S.C. (2014). Microbial co-culture: harnessing intermicrobial signaling for the production of novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 9(5), 575–578.
- Mootz H.D., Schwarzer D., and Marahiel M.A. (2002). Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*, 3(6), 490-504.
- Mordarska H., Mordarska M., Goodfellow M. (1972). Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *Journal of General Microbiology* , 71(1), 77–86.
- Motamed S., Ghaemmaghami F., and Alemzadeh I. (2009). “Turnip (*Brassica rapa*) peroxidase: purification and characterization,” *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(23), 10614–10618.
- Muiru W.M., Mutitu E.W., Kimenju J.W., Koopmann B., Tiedemann A.V. (2008), Infectious structures and response of maize plants to invasion by *Exserohilum turcicum* in compatible and incompatible host pathogen systems. *Journal of Applied Biosciences*, 10(2), 532- 537.
- Myronovskyi, M., Tokovenko, B., Manderscheid, N., Petzke, L., & Luzhetskyy, A. (2013). Complete genome sequence of *Streptomyces fulvissimus*. *Journal of biotechnology*, 168(1), 117-118.

**N**

- Nachtigall J., Schulz D., BeilD., Süßmuth & H.P., Fiedler J.(210). *Antibiotics*, 63, 397-399.
- Nambudiri, A. M. D., Bhat, J. V., & Rao, P. S. (1972). Conversion of p-coumarate into caffeate by *Streptomyces nigrifaciens*. Purification and properties of the hydroxylating enzyme. *Biochemical Journal*, 130(2), 425-433.
- Nandhini T, Anju KR, Manikandanathan VM, Vaidyanathan VG, Nair BU(2015 May). Interactions of Ru(II) polypyridyl complexes with DNA mismatches and abasic sites. *Dalton Trans*. 21;44(19):9044-51
- Narayana K.J., Kumar K.G., Vijayalakshmi M.L.(2008).asparaginase production by *Streptomyces Albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 331-336.
- Nekhili H. (1996). Classification numérique des genres *Actinoplanes*, *Couchioplanes* et *Micromonospora* (*Actinomycetales*) isolés des sols des zones arides algériennes. Purification et caractérisation partielle des principales molécules antifongiques synthétisées. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger.
- Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. (1999). Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals, *Protein engineering* ,12 ,3–9.
- Nithya K., Muthukumar C., Duraipandian V., Dhanasekaran D., Thajuddin N.(2015). Diversity and antimicrobial potential of culturable Actinobacteria from desert soils of Saudi Arabia. *Journal of Pharmaceutical Science Research*, 7(3), 117-122.

Nolan, R. D., & Cross, T. H. O. M. A. S. (1988). Isolation and screening of actinomycetes. *Actinomycetes in biotechnology*, 1-32.

Nouredine L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algérie). Pp. 186.

**O**

O 'Gara F., Dowling D.N., Boesten B. (2008). Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs. John Wiley & Sons: Weinheim, P. 192.

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., & Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of bacteriology*, 190(11), 4050-4060.

OskayMustafa. (2009). Comparaison of *Streptomyces* diversity between agricultural and non-agricultural soils by using various culture media, *Scientific Research and Essay*, 4(10), 997-1005.

Olmos, B., Yu, D., Singh, Y., Schreck, F., Bongs, K., & Lesanovsky, I. (2013). Long-range interacting many-body systems with alkaline-earth-metal atoms. *Physical review letters*, 110(14), 143602.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., & Kikuchi, H. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12215-12220.

Oskay, A. M., Üsame, T., & Cem, A. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African journal of Biotechnology*, 3(9), 441-446.

Oskay, T., Aykol, N., & Sahillioğlu, M. (2005). Metastatic Crohn's disease in a child. *Clinical and experimental dermatology*, 30(4), 358-360.

Ou X., Zhang B., Zhang L., Dong K., Liu C., Zhao G., Ding X. (2008). SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40 (10), 877-882.

Ozeki K., Kanda A., Hamachi M., Nunokawa Y., (1996). Construction of a promoter probe vector autonomously maintained in *Aspergillus* and characterization of promoter regions derived from *A. niger* and *A. oryzae* genomes. *Bioscience and Biotechnology Biochemistry*. Mar, 60(3), 383–389.

**P**

Pandey, R. K., Maranville, J. W., & Chetima, M. M. (2000). Deficit irrigation and nitrogen effects on maize in a Sahelian environment: II. Shoot growth, nitrogen uptake and water extraction. *Agricultural Water Management*, 46 (1), 15-27.

- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.
- Park, J. O., El- Tarabily, K. A., Ghisalberti, E. L., & Sivasithamparam, K. (2002). Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soilborne fungal pathogens. *Letters in applied microbiology*, 35(5), 361-365.
- Park Y., Kang S., Lee J., Hong S., Kim S. (2002). Xylanase . Production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied. Microbiology and. Biotechnology*, 58(6), 761–766.
- Passari, A. K., Chandra, P., Leo, V. V., Mishra, V. K., Kumar, B., & Singh, B. P. (2017). Production of potent antimicrobial compounds from *Streptomyces cyaneofuscatus* associated with fresh water sediment. *Frontiers in microbiology*, 8, 68.
- Peela S., Kurada B., Terli R. (2005).Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World Journal of Microbiology and .Biotechnology*, 21(4), 583-585.
- Perry J.J., Staley J.T.,et Lory S. (2004). *Microbiologie*. Paris, Dunod. Pp. 497–498.
- Petrosyan P, García-Varela M, Luz-Madrigal A, Huitrón C, Flores ME. (2003 Jan) . *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* ; 53(Pt 1):269-73.
- Peter J. DeJongL-Asparaginase Production by *Streptomyces griseus*. *Applid Microbiology*, June 1972, p. 1163-1164, Copyright i 1972 American Society for Microbiology, 23(6). Printed in U.SA.
- Pethick, F., MacFadyen, A., Tang, Z., Sangal, V., Liu, T. T., Chu, J., & Hoskisson, P. (2013). Draft genome sequence of the oxytetracycline-producing bacterium *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. *Genome announcements*, 1(2), e0006313.
- Pillmoor J.B. (1998). Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature. *Journal of Pesticide Science*., 52(1), 75-80.
- Pochon J., Tardieu P. (1962). Technique d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la Tourtourelle, Saint-Mandé.
- Potvin J. (1992). Ph.D.Thesis no. 1044. Ecole Polytechnique Fkdrale de Lousanne, Suisse.
- Pullan, S. T., Chandra, G., Bibb, M. J., & Merrick, M. (2011). Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes. *BMC genomics*, 12(1), 175.
- Prescott, M. B., & Conger, S. A. (1995). Information technology innovations: a classification by IT locus of impact and research approach. *ACM SIGMIS Database: the DATABASE for Advances in Information Systems*, 26(2-3), 20-41.
- PrescottL.M., Harley and Klein. (2002). VIII Ecology and Symbiosis .In *Microbiology*.Fifth edition. The McGraw-Hill Companies, p. 596-697.

- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2010). Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2<sup>eme</sup> edition, p.1088.
- Pridham T.G., Hesseltine C.W., Benedict R.G. (1958). A guide for the classification of Streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. Applied. Microbiology, 6(1), 52-70.
- Priyadharsini P., Dhanasekaran D., Kanimozhi B. (2013). Isolation, structural identification and herbicidal activity of N-phenylpropanamide from *Streptomyces* sp. KA1-3. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 46(3), 364-373.
- Priyadharsini P., Dhanasekaran D., Kanimozhi B. (2013). Isolation and structural characterization of N-(naphthalene-1-yl) Propanamide, a herbicidal compound from *Streptomyces* sp. KA1-3. In: Microbiological Research in Agroecosystem Management (Rajesh Kannan Eds), p. 187-195. Springer, India. Properties, second ed. American.Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison.Pp. 969–987.
- Priyadharsini P., Dhanasekaran D. (2015). Diversity of soil allelopathic Actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences , 14 (1), 54-60.

## R

- Rahman M.A., Islam, M.Z., et Islam M.A. (2011). Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-6.
- Rangaswami G., Bagyaraj D.J., Bagyaraj D.G. (2004). Agricultural Microbiology. PHI: New Delhi. Pp. 440.
- Rapilly, F. (1968). Les techniques de mycologie en pathologie végétale.
- Rastall R. (2007). Novel Enzyme Technology for Food Applications, Woodhead Publishing, Cambridge, UK.
- Renvoise A., Roux V., Raoult D. *Actinomyces massiliensis* sp. nov., isolated from a patient blood culture. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2009. Mars, 59(Pt 3), 540-04.
- Renvoise A., Roux V., Raoult D. *Actinomyces timonensis* sp. nov., isolated from a patient osteo-articular sample. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2010 Jul, 60(Pt 7), 1516-21.
- Remya M., and Vijayakumar R. (2008). Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. Medicine and Biology, 159(1), 13-19.
- Reller, L. B., Weinstein, M. P., & Petti, C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. Clinical infectious diseases, 44(8), 1108-1114.

- Rheims H., Felske A., Seufert S., and Stackebrandt S. (1999). Molecular monitoring of an uncultured group of the class *Actinobacteria* in two terrestrial environments. *Journal of Microbiology Methods*, 36(1-2), 65-75.
- Richter M., Rosselló-Móra R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 106(45), 19126–19131.
- Rickes E.L., Brink N.G., Koniuszy F.R., Wood T.R., Folkers K. ( 1948). Crystalline vitamin B12. *Science.*, 107(2781), 396-397.
- RiedlingerJ., Schrey S.D., Tarkka M.T., Hampp R., Kapur M.& H.P., Fiedler. (2006). Applied. Environnement .*Microbiology*, 72, 3550-3557.
- Rintala, R. J., & Lindahl, H. G. (2001). Fecal continence in patients having undergone posterior sagittal anorectoplasty procedure for a high anorectal malformation improves at adolescence, as constipation disappears. *Journal of pediatric surgery*, 36(8), 1218-1221.
- Rodríguez Concepción M., and A., Boronat (2013). Isoprenoid biosynthesis in procaryotic organisms.In Isoprenoid Synthesis in plant and Microorganisms.eds. T.J. bach, and M. Rohmer. pp. 1-16. New York; Heidelberg. Germany: Dordrecht, the Netherlands: London. UK, Springer.
- Rossi L.M., Quach A.D., and Rosenzweig Z. (2004). “Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing,” *Analytical& Bioanalytical Chemistry*, 380(4), 606–613.
- Ruan L., Huang Y., Zhang G., Yu D., Ping S. (2002). Expression of the mel gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis*, Letter of Applied of Microbiology, 34, 244.
- Rückert, C., Albersmeier, A., Busche, T., Jaenicke, S., Winkler, A., Friðjónsson, Ó. H., & Anne, J. (2015). Complete genome sequence of *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of biotechnology*, 199, 21-22.)
- Rückert C, Albersmeier A, Al-Dilaimi A, Bednarz H, Niehaus K, Szczepanowski R, Kalinowski J. (2013 Dec). Genome sequence of the squalene-degrading bacterium *Corynebacterium terpenotabidum* type strain Y-11(T) (= DSM 44721(T)). Stand Genomic Sci. 31;9(3):505-13.
- RutherfordK., ParkhillJ., Crook J., Horsnell T., Rice P., Rajandream M.A., and Barrell B.(2000). Artemis sequence visualization and annotation Bioinformatics, 16(10),944-945.
- S**
- SaadounI., and MuhanaA. (2008). Optimal production conditions, extraction, partial purification and characterization of inhibitory compound(s) produced by *Streptomyces* Ds-104 isolate against multi-drug resistant *Candida albicans*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy - Journals*. 2(2), 402–420.

- Sabaou N., Amir H., and Raunaga D. (1980). Le palmier dattier et la fusariose. X. Denombrement des actinomycetes de la rhizosphère. Leur antagonisme vis à vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. albedinis. Annal of Phytopathology, 12, 253-257. Tortora *et al.*, 2003.
- Sabaou N. (1988). Contribution à l'étude des Actinomycètes des sols des palmeraies Algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat en Microbiologie des sols. Université des Sciences et de la technologie Houari Boumediene. Alger. P.192.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G., and Germain P. (1998). Les sols du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse, 9, 147–153.
- Saffroy S. (2006). Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Loraine. France. P. 150.
- Saha S., Dhanasekaran D., Shanmugapriya S., Latha S. *Nocardiopsis* sp. (2013). SD5: a potent feather degrading rare actinobacterium isolated from feather waste in Tamil Nadu, India. Journal of Basic Microbiology, 53(7), 608-616.
- Saker, R., Meklat, A., Bouras, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Spröer, C., . & Sabaou, N. (2015). Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. Annals of microbiology, 65(4), 2241-2253.
- Saitou N., and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Savic, M., & Vasiljevic, B. (2006). Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 423.
- Seeman T., Vondrak K., Dusek J., Simankova N., Zieg J., Hacek J., Chadimova M., Sopko B., Fortova., M. (2017). Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Does Not Distinguish Acute Rejection from Other Causes of Acute Kidney Injury in Pediatric Renal Transplant Recipients. Clin Lab. 63(1):111-114.
- Saker., R & Meklat., A & Bouras., N & Zitouni., A & Mathieu., F & Spröer., C & Klenk., HP & Sabaou., N (2015). Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara:M'zab and Zibans. Annal of Microbiology .
- Sanglier J.J., Haag h., Huck T.A.,et Fehr T. (1993). Novel bioactive compounds from actinomycetes. Research in Microbiology, 144, 661-663.
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. (1977). Proceedings of the National Academy of Sciences. . U. S. A., 74, 5463-5467.
- Sanglier J.J., et TrujilloM. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. Bull Société Francaise de Microbiologie, 12,13.

- Sanscartier D., Zeeb B., Koch I., Reimer K. (2009). Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. *Cold Regions Science and Technology*, 55(1), 167-173.
- Saratale R.G., Saratale G.D., Chang J.S., Govindwar S.P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 42, 138-157.
- Saratale R.G., Saratale G.D., Chang J.S., and Govindwar S.P. (2011). "Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review," *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138–157.
- Sarkar S., Saha M., Roy D., Jaisankar P., Das S., Gauri Roy L., Gachhui R., Sen T. And Mukherjee J. (2008). Enhanced production of antimicrobial compounds by three salt-tolerant actinobacterial strains isolated from the sundarbans in a niche-mimic bioreactor. *Marine Biotechnology*, 10, 518-526.
- Schaerlaekens K., van Mellaert L., Lammertyn E., Geukens N., Anne J., The importance of the Tat-dependent protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis, *Microbiology*, 150(2004), 21–31.
- Schimana J., Gebhardt k., Müller J., Höltzel A., Schmid D.G., Süssmuth R., Pukall R., & H.P., Fiedler J. (2002). *Antibiotics*, 55, 565-570.
- Schneider K., Nicholson G., Strobel M., Baur S., Niehaus J., Fiedler H.P., Süssmuth R.D. (2006). The structures of fluostatins C.D., and E., novel members of the fluostatin family. *Journal of Antibiotics*, 59(2), 105.
- Sheerin, D. J., Menon, C., zur Oven-Krockhaus, S., Enderle, B., Zhu, L., Johnen, P., & Hiltbrunner, A. (2015). Light-activated phytochrome A and B interact with members of the SPA family to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis* by reorganizing the COP1/SPA complex. *The Plant Cell*, 27(1), 189-201.
- Scherr, N., & Nguyen, L. (2009). *Mycobacterium* versus *Streptomyces* we are different, we are the same. *Current opinion in microbiology*, 12(6), 699-707
- Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La S.B., Fournier P.E., Rolain J.M., & Raoult D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 543-551.
- Singh, S. B., & Barrett, J. F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery—foundation in natural products. *Biochemical pharmacology*, 71(7), 1006-1015.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. (2011). Fast scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 11, 539.

- Sharmin S., Towhid Hossain M.D., Anwar M.N. (2005). Isolation and characterization of a protease producing bacteria *Bacillus amonvivorus* and optimization of some factors of culture conditions for protease production. *Journal of Biological Sciences.* 5(3), 358-362.
- Shirling E.B. et Gottlieb D.(1966).Methods for characterization of *Streptomyces* species.*Int Journal of Systimatic Bacteriolog*, 16(3), 313–340.
- Shirling, E.B.,et Gottlieb, D.(1966).Retrospective evaluation of international *Streptomyces* proyect taxonomic criteria- the Boundary Microorganisms. *Toppan Printing Co Ltd .*, 161 , 9–41.
- Shukla S.K., Kislow J., Briska A., Henkhaus J., and Dykes C., “Optical mapping reveals a large genetic inversion between two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains,” *Journal of Bacteriology*, 191(18), 5717–23, Sep. 2009.
- Smaoui S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France,P.251.
- Schmid, R. D., & Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(12), 1608-1633.
- Smith D.J., Burnham M.K., Bull J.H., Hodgson J.E., Ward J.M., Browne P., Brown J., Barton B., Earl A.J.,Turner G. (1990). Beta-lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. *Journal of the European Molecular Biology Organization*9, 741–747.
- Sneath, P. H. A. (1989). Analysis and interpretation of sequence data for bacterial systematics: the view of a numerical taxonomist. *Systematic and Applied Microbiology*, 12(1), 15-31.
- Sokolovska I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P.G., Agathos S.N.,Wattiau P.(2003). Crabon Source-induced modification in mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* El. Application. Environment. *Microbiology*,69, 701.
- Solanki R., Khanna M., and Lal R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian. Journal of . Microbiology*, 48, 410-431.
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Central European Journal of Biology*7, 373-390.
- Song J., Weon H.Y., Yoon S.H., Parrk D.S., GoS G., Suh J.W. (2001). Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinimycetes isolated from mushroom composts in Korea based on 16S RNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Letters* , 202, 97-102.
- SouaguiY., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C., Kecha M. (2015). Optimization of antifungal production by an alkaliphilic and halotolerant actinomycete, *Streptomyces* sp. SY-BS5, using response surface methodology. *Journal de Mycologie Médicale*, 25, 108-115.

- Srivibool R., and Sukchotiratana M. (2006). Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.*, 28, 493-499.
- Srivibool, R., Jaidee, K., Sukchotiratana, M., Tokuyama, S., & Pathom-aree, W. (2010). Taxonomic characterization of *Streptomyces* strain CH54-4 isolated from mangrove sediment. *Annals of microbiology*, 60 (2), 299-305.
- Stackebrandt E., and Woese C.R. (1981).The evolution of prokaryotes.*Symposia of the Society for General Microbiology*, 32, 1–31.
- Stackebrandt E., Winner-Fussl B., Fowler V.J., Schillfer K.H. (1981). Deoxyribonucleic acidhomologies and ribosomal ribonucleic acid similarities among spore forming members of the order Actinomycetales. *International Systematic Bacteriology*, 31, 420–431.
- Stackebrandt E., Rainey F.A., and Ward-Rainey N.L. (1997). A proposal for a new hierachic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 479–491.
- Stackebrandt E., and Goebel B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S Rrna sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846–849.
- Stackebrandt E., and Schumann P.(2006). Introduction to the taxonomy of *Actinobacteria*.*Prokaryotes*, 3, 297–321.
- Staneck J.L., and Roberts G.D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thinlayer chromatography. *Journal of Applied Microbiology*, 28, 226-231.
- Stanca S.E., Popescuo I.C., and Oniciu L. (2003). “Biosensors for phenol derivatives using biochemical signal amplification,” *Talanta journal*, 61(4), 501–507.
- Staneck J.L., Roberts G.D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography.*Applied Microbiology*,28(2),226–231.
- Staufenberger T., Thiel V., Wiese J., Imhoff J.F. (2008). Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiology Ecology* , 64, 65–77.
- Stackebrandt E.,& EbersJ. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, p. 152-155.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampfer P., Maiden M. C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C. & Whitman W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1043-1047.
- Studholme, D. J. (2016). Genome Update. Let the consumer beware: *Streptomyces* genome sequence quality. *Microbial biotechnology*, 9(1), 3-7.

- Strub C. (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat de l’Institut National Polytechnique de Toulouse, France, P. 203.
- Sugawara T., Tanba T., Kaneda Y., Yamamoto H., Adachi T. (1999). Antifungal thiazolylpyridine compound from *Saccharothrix* species and pharmaceutical compositions containing it *Japanese Kokai Tokkyo Koho*, p. 10.9.
- Summers. (2006). “A lightening tour of skin brightening option,” *South African Pharmaceutical and Cosmetic Review*, 33(6), 29–30.
- Sewan N., Boonying W., et Nalumpang S. (2012). Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Agricultural Technology*, 8(2), 725-737.
- Suzuki S., Okuda T., et Komatsubara S. (2001). Selective isolation and study on global distribution of the genus *Planobispora* in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(11), 979–986.
- Sykes G., Skinner F.A. (1973). Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Academic press. London. New York. Saffroy S. (2006). Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France, p. 150.
- T**
- Takasaki S., and Kawakishi S. (1997). “Formation of protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine as new cross-linkers in gluten,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3472–3475.
- 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(3), 141-154.
- Takizawa M., Colwell R.R., & Hill, R.T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 997–1002.
- Tanaka Y., and Omura S. (1990). Metabolism and products of Actinomycetes—an introduction. *Actinomycetologica*, 4 (1), 13-14.
- Tan H., Deng Z., Cao L. (2009). Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., Bora T.C. (2007). Isolation and screening of *Streptomyces* in soil), of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites., *Journal de Mycologie et Médecine*, 17(4), 242-249.
- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d’intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, 612-425.

- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V, 612- 425.
- Theron S.A., A.L., Yarin E., Zussmana E., Kroll Polymer, 46(2005), 2889–2899.
- Tiraby, G., & Etienne, G. (1983). The future of *Streptomyces* industrial production of antibiotics; production of polypeptides]. *Biofutur (France)*.
- Tiwari K., Gupta R.K. (2013). Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. Critical Reviews in Biotechnology, 39,256–294.
- Tiwari et Gupta. (2011).Zitouni. A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix sp SA 103*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, (Algérie), 230 p.
- Toumatia O. (2010). Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Mémoire de Magister, spécialité : Microbiologie. Ecole Normale Supérieur de Kouba, Alger, p.115.
- Toumatia O., Yekkour A., Goudjal Y., Riba A., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Zitouni A. (2014). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. Journal of Basic Microbiology, 54,1–8.
- 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.
- Tresner H.D., Davies M.C., and Backus E.J. (1961). Electron microscopy of *Streptomyces* spores morphology and its role in species differentiation. *Journal. Bacteriology*, 81, 70-80.
- U**
- Ullah, I., Arshad, M., Chuadhry, M. J. I., Noureen, U., Jadoon, W. A., & Jadoon, M. A. (2012). Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. Rec Zool Surv Pakistan, 21, 10-13.
- Usama Ramadan Abdelmohsen, Tanja Grkovic, Srikanth Balasubramanian ,Mohamed Salah Kamel, Ronald J., Quinn, Ute Hentschel. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes , Biotechnology Advances . Volume 33, Issue 6, Part 1, 1 November 2015, 798-811 p.
- V**
- Vijayakumar R., Muthukumar C., Thajuddin N., Pannerselvam A., Saravanamuthu R. (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of bay of Bengal, India. Actinomycetologica, 21, 59-65.
- Vonothini G., Murugan M., Sivakumar K., and Sudha S. (2008). Optimization of protease production by an actinomycete Strain , PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. Agriculture and Forestry Journal , 7(18), 3225–3230.
- W**

- Waksman S.A. (1961).The Actinomycetes. Volume 2: Classification, identification and descriptions of genera and species. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Waksman S.A., and Henrici A.T. (1943).The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 46, 337-341.
- Wang, Y., Wang, J. J., Wang, W. Y., Mei, Z. G., Shang, S. L., Chen, L. Q., & Liu, Z. K. (2010). A mixed-space approach to first-principles calculations of phonon frequencies for polar materials. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 22(20), 202201.
- Wang K.H., Lin R.D., Hsu F.L. (2006). Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines," *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 353–359.
- Warren H.B., Prokop J.F., Grundy W.E. (1955).Non-synthetic media for antibiotic producing actinomycetes.*Antibiotic Chemotherapy* (5),6–12.
- 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., (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 37, 463–464.
- Weissman, K. J., & Müller, R. (2009). A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(6), 2121-2136.
- Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki Ki., Parte A. (Eds). vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York, p.1750. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. (2012).
- Wiese J., Thiel V., Gartner A., Schmaljohann R., & Imhoff J.F.(2009). *Kiloniella laminariae* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobac-terium from the marine macroalga *Laminaria saccharina*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 350–356.
- Williams S.T. (1978). Streptomycetes in the soil ecosystem. In: M. Mordarski, W. Kurylowicz, and J. Jeljaszewicz (Eds.), *Nocardia and Streptomyces*: Proceedings of the International Symposium on Nocardia and Streptomyces, Warsaw, 1976.
- Williams S.T., CrossT. (1971).Actinomycetes. In: Methods in microbiology. Booth C.Ed., Academic Press, London, 4, 295–334.
- Williams S.T., Wellington E.M.H. (1984). Ecology of Actinomycetes.In : Goodfellow, M., (Eds.), The biologie of the Actinomycetes. London, p.481-528.
- Williams S.T., Wellington E.M.H.( 1982a). Actinomycetes. In: Eds. Page A.L., Miller R.H., Keeney O.R.: Methods of Soil Analysis, part 2, Chemical and Microbiological Properties, second ed. American . Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, p. 969–987.
- William S.T., Lanning S. and Wellington E.M.H. (1993). Ecology of actiomyces . In: The biology of actinomycets. Goodfellow et al., eds. Academic pres. London, p.481-528.
- WilliamsS.T. Parekh N.R. et MunroJ.C. (1993).Isolation of actinophage that attack some maduromycete actinomycetes.*FEMS Microbiology Letters*, 108(2), 195-200.

**Wu R.Y.**(1984).Studies on the *Streptomyces* SC4.II Taxonomic and biological characteristics of strain SC4. Botanical Bulletin- Academia Sinica, 25,111–123.

**Wu H, Liu W, Dong D, Li J, Zhang D, Lu C** (2014) *SlnM* gene overexpression with different promoters on natamycin production in *Streptomyces lydicus* A 02. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:163–172.

## X

**Xiao K., Kinkel L.L., and Samac D.A.** (2002). Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, 23(3), 285–295.

**Xiliang J.** (1994).The mechanism of agricultural antibiotic.*Biological Control Aviso*, 10(2), 76-81.

**Xu L.H., Li Q.R., Jiang C.L.** (1996). Diversity of soil actinomycetes in Yunnan.China Applied in Environnemental and Microbiology, (62), 244-248.

## Y

**Yamamura HShimizu A., Nakagawa Y., Hamada M., Otoguro M., Tamura T.,& Zhang J.**(2011). Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. *Modern Applied Science*, 5(2), 124-215.

**Yan Chu S.** (1993). New developments of agricultural antibiotic pesticide.*Trans. (China)*,15(6), 5-12.

**Yang J.Y, Lee H.S.** (2015). Antimicrobial activities of active component isolated from *Lawsonia inermis* leaves and structure-activity relationships of its analogues against food-borne bacteria. *J Food Sci Technol.*;52(4):2446-51.

**Yekkour A., Meklat A., Bijani C., Toumatia O., Errakhi R., Lebrihi A., Mathieu F., Zitouni A., Sabaou N.** (2015). A novel hydroxamic acid-containing antibiotic produced by a Saharan soil-living *Streptomyces* strain.*Letter Microbiology*, 60(6), 589–596.

**Y Hu,, Martinez, E. D., & MacMillan, J. B.** (2012). Anthraquinones from a marine-derived *Streptomyces spinoverrucosus*. *Journal of natural products*, 75(10), 1759-1764.

## Z

**Zaburannyi N, Rabyk M, Ostash B, Fedorenko V, Luzhetsky A.** (2014 Feb). Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. *BMC Genomics*. 5;15:97.

**Zhang, Z., Wang, Y., & Ruan, J.** (1997). A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1048-1054.

**Zermane F.** (2007). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse,p.33-38.

**Zermane F.** (2008). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés de synthèse. Magistère en Option Biotechnologies microbiennes. Université Mentouri Constantine. Algérie, p.126.

- Zhou Y., Liang Y., Lynch K. H., Dennis J. J. and Wishart D. S. (2011). PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 39 (suppl\_2), 347-352.
- Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., Labeda D.P. (2004). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., a new species isolated from a Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1377–1381.
- Zitouni A. (2005). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardiopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat Es-Sciences, spécialité : Microbiologie. Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, p. 230.
- Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005). *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*, 156(10), 984-993.

# **Annexes**

## Annexe I : Composition de milieu de culture

### I.- Milieux d'identification des actinobactéries

#### 1. Etude morphologique

Milieu GLM (Gélose à l'extrait de levure et de Malt).

Extrait de levure : 3g ; Extrait de malt : 3g ; Peptone : 5g; Glucose : 10g ; Agar : 15g ; Eau distillée : 100ml ; pH : 7.2.

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International Streptomyces Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

- ISP2: Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL; agar: 20 g. pH 7,2.

- ISP3: Farine d'avoine: 20 g; solution saline standard(\*): 1 mL; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

(\*) Solution saline standard: FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,1 g; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 0,1 g; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,1 g; eau distillée q.s.p. 100 mL.

- ISP4: Amidon: 10 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 1 g; NaCl: 1 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g; CaCO<sub>3</sub>: 2g; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

ISP-5:(Glycerol-asparagineagar): L-asparagine (anhydrous basis) 1.0g ; Glycerol10.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydrous basis) 1.0g ; Distilled Water 1.0 litre, Trace Salts Solution 1.0ml, pH : 7.0-7.4, Agar : 20.0g.

- Gélose nutritive: Peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; NaCl: 5 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,5.

Rapport-gratuit.com  
LE NUMÉRO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

#### 2. Etude physiologique

##### 2.1. Dégradation des glucides et dérivés

Les glucides, stérilisés à l'éther, sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1%.

La croissance des souches en fonction des sources de carbone est estimée sur milieu ISP9 de (**Pridham et Gottlieb, 1948**). Ce milieu est subdivisé en trois parties:

**Solution A:** composée de sources de carbone (10 g L<sup>-1</sup> dans l'eau distillée) stérilisées par l'éther sous hotte axénique.

**Solution B:** solution saline dont les constituants seront utilisés à l'état de traces dans le milieu final. Elle est composé de: sulfate de cuivre: 0,64 g; sulfate ferreux: 0,11 g; chlorure de manganèse: 0,79 g; sulfate de zinc: 0,15 g; eau distillée 100 ml. Cette solution est conservée au réfrigérateur.

**Solution C:** milieu minéral de base. Il est composé de: sulfate d'ammonium: 2,64 g; phosphate monopotassique: 2,38 g; phosphate bipotassique: 5,65 g; sulfate de magnésium: 1 g; solution B: 1 mL; eau distillée q.s.p. 1000 mL; pH 7,5.

L'agar est ajouté au milieu qui est ensuite stérilisé à l'autoclave. Le milieu final est obtenu en mélangeant aseptiquement 100 mL de solution A et 900 mL de solution C. Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinobactéries en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif). Le milieu contenant du glucose sert de témoin positif.

La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

## **2.2.- Production de pigments mélanoïdes.**

\* **Milieu ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966)**

Glycérol: 15 g; L-tyrosine: 0,5 g; L-asparagine: 1 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,5 g; NaCl: 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,01 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL; agar: 18 g; eauDistillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

\***MPPM** : modified phenoxazinone production medium) : Glycérol: 10 g; glucose: 10 g; farine de soja : 10 g; casaminoacide :5 g ; extrait de levure :5 g ; CACO<sub>3</sub>: 4 g ; 1 ml solution saline ( g/100 ml: 1 g FeSO<sub>4</sub> ;0.9 g ZnSO<sub>4</sub>; 0.2g Mn SO<sub>4</sub> ) ; agar: 18 g; eau Distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

## **II.- MILIEUX DE PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES**

**1.- Milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966)**

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH7,2.

**2- Milieu de Bennett:** Glucose: 10g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; extrait de viande: 1 g, eau distillée: 1000 mL; agar: 15 g; pH = 7,3.

## **III.- MILIEU POUR LES CHAMPIGNONS**

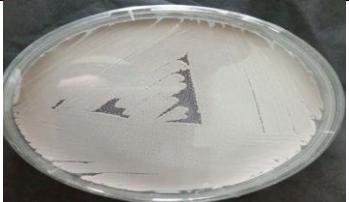
\* **Milieu PDA (Rapilly, 1969)**

Filtrat de pomme de terre: 500 mL; glucose: 20 g; agar: 20 g; eau distillée: 500 mL. pH 5,6. Le filtrat est préparé en mettant à bouillir 200 à 250 g de pomme de terre épluchée dans 500 mL d'eau distillée.

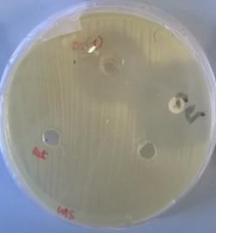
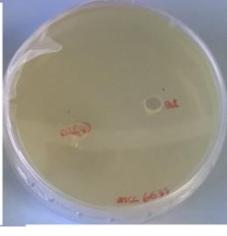
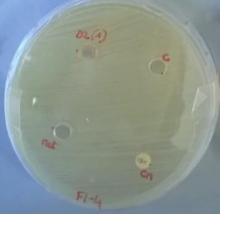
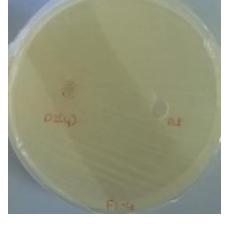
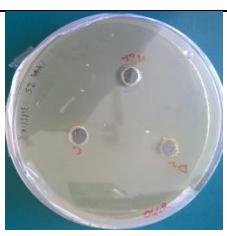
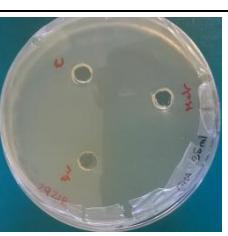
## **IV. Milieu de culture de sporulation des actinobactéries**

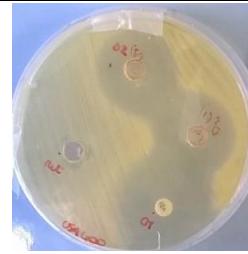
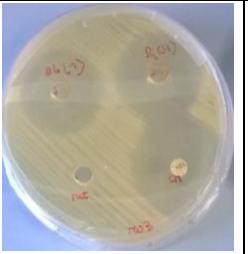
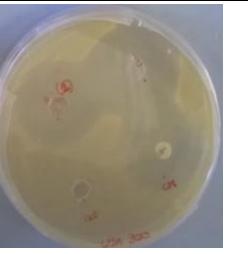
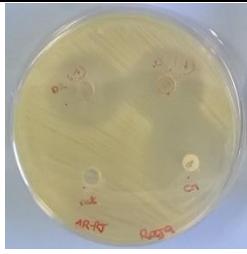
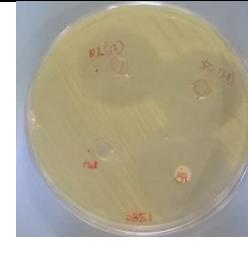
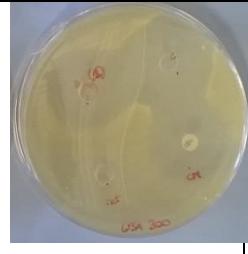
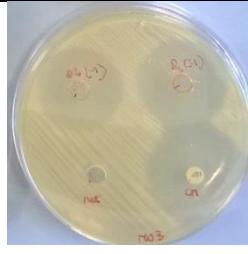
Farine de Soja Mannitol agar (MS or SFM) :C'est un milieu de sporulation de plusieurs espèces des *Streptomyces* (*S. scabies* and *S. venezuelae* ) : Mannitol : 2g; Farine de soja (Holland and Barrett): 2g; CaCl<sub>2</sub> : 10 mM ; Agar : 2g ; Eau distillée : 100 mL ;Ph : 7.2.

**Annexe II :** Observation de mycélium de substrat et mycélium aérien des isolats d'actinobactéries après 7 jours d'incubation.

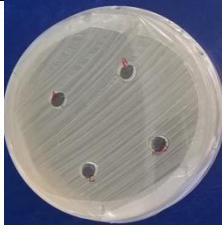
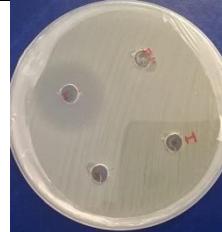
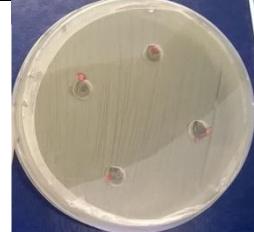
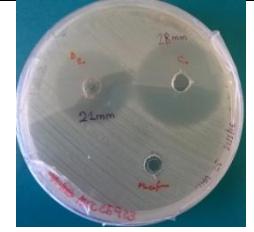
Isolat d'actinobactéries	Milieu de culture	Aspect macroscopique du mycélium aérien	Aspect macroscopique du mycélium de substrat
Isolat D2	ISP4		
	ISP5		
	ISP7		
	GN		
Isolat MS1	ISP4		
	ISP5		
	ISP7		
	GN		

**Annexe III : Photos de l'antibiogramme de l'extrait brut (souche D2)**

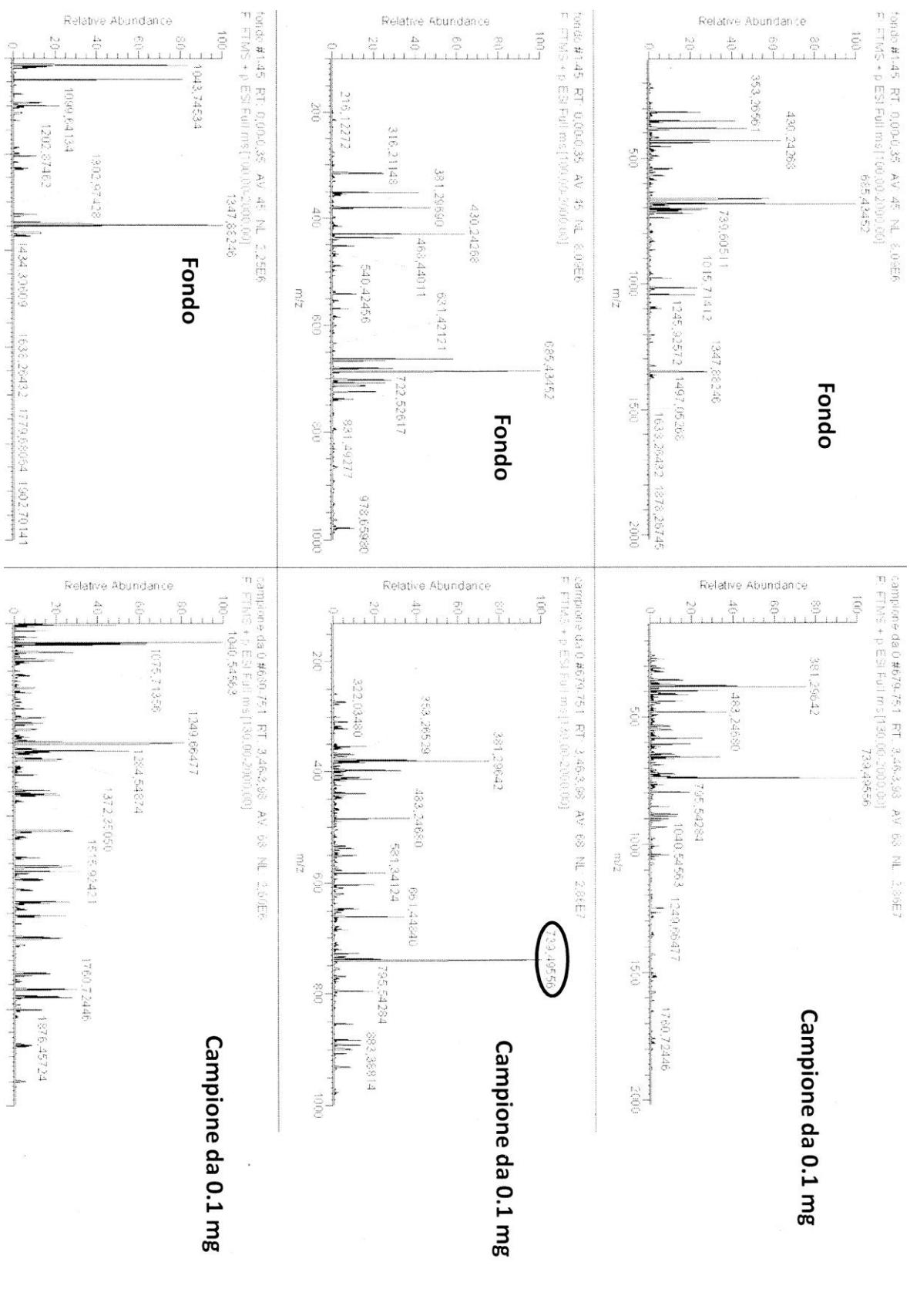
			
<i>Staphylococcus aureus Mu50</i>	<i>Staphylococcus aureus Mu50</i>	<i>Staphylococcus aureus WIS</i>	<i>Staphylococcus aureus WIS</i>
			
<i>Bacillus subtilis 6633ATCC</i>	<i>Bacillus subtilis 6633ATCC</i>	<i>Staphylococcus epidermidis F1-4</i>	<i>Enterococcus faecalis MR148</i>
			
<i>Enterococcus faecium Mzn</i>	<i>Staphylococcus epidermidis F1-4</i>	<i>Enterococcus faecium Mzn</i>	<i>Enterococcus faecalis MR148</i>
			
<i>Enterococcus faecium Mzn</i>	<i>Staphylococcus aureus USA400</i>	<i>Staphylococcus aureus USA300</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa VR-143 /97</i>
			
<i>Klebsiella pneumoniae 044R</i>	<i>Acinetobacter baumannii MR 157</i>	<i>Enterococcus Faecalis ATCC29212</i>	<i>E. Coli ATCC 25922</i>

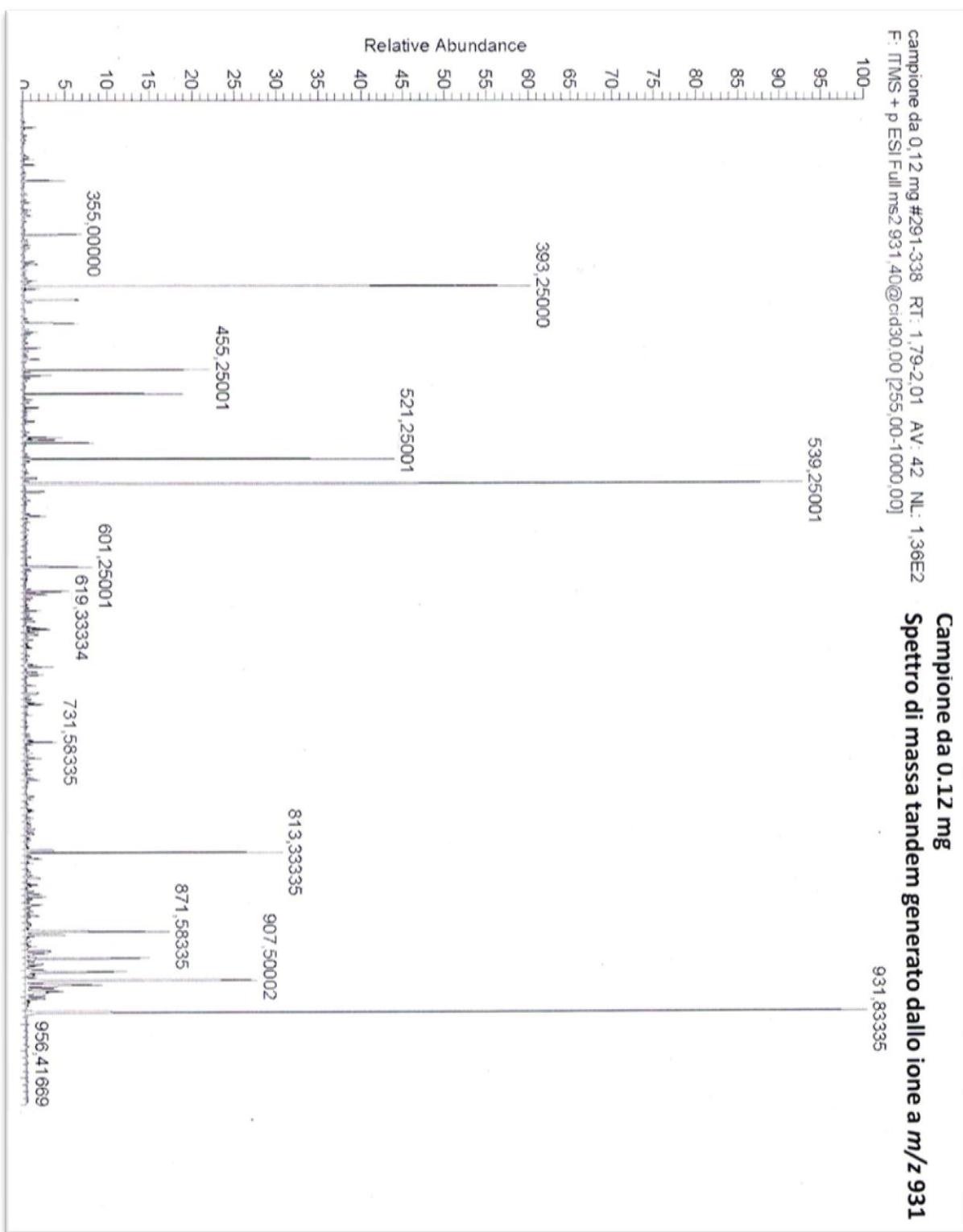
			
<i>Staphylococcus aureus USA300</i>	<i>Staphylococcus aureus USA400</i>	<i>Staphylococcus aureus Mu3</i>	<i>Staphylococcus aureus USA300</i>
			
<i>Staphylococcus aureus 3851</i>	<i>Staphylococcus aureus Ar-Rj</i>	<i>Staphylococcus aureus 25923ATCC</i>	<i>Staphylococcus aureus Si-BRC</i>
			
<i>Staphylococcus aureus 25923ATCC</i>	<i>Staphylococcus aureus 25923ATCC</i>	<i>Staphylococcus aureus Si-BRC</i>	<i>Staphylococcus aureus 25923ATCC</i>
			
<i>Staphylococcus aureus Ar-Rj</i>	<i>Staphylococcus aureus 3851</i>	<i>Staphylococcus aureus USA300</i>	<i>Staphylococcus aureus Mu3</i>

			
<i>S. haemolyticus MR1002</i>	<i>S. epidermidis ATCC 14990</i>	<i>S. warneri Pz240/M</i>	<i>S. hominis Pz6097/1</i>

			
<i>S. aureus</i> <i>Souche de</i> <i>référence, type</i> <i>sauvage</i>	<i>S. aureus</i> <i>Souche de</i> <i>référence, type</i> <i>sauvage</i>	<i>S. aureus</i> <i>Souche de</i> <i>référence, type</i> <i>sauvage</i>	<i>S. aureus</i> ATCC29223

**Annexe V : Spectre de masse du composé actif ‘H’ et ‘H2’ (en mode positif).**





H2

181

# **Publications**

## Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities

Harir Mohamed<sup>1,3</sup>, Bellahcene Miloud<sup>2</sup>, Fortas Zohra<sup>1</sup>, José María García-Arenzana<sup>4</sup>, Antonio Veloso<sup>5</sup>, Susana Rodríguez-Couto<sup>6,7\*</sup>

1. Biology of Microorganisms and Biotechnology Laboratory, University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria.

2. Faculty of Sciences, Natural and Life Sciences Department, Mohamed Boudiaf University, M'sila, Algeria.

3. Institut of Sciences, Faculty of Sciences, Natural and Life Sciences Department, University Center of Ain Temouchent, Temouchent, Algeria.

4. Microbiología, Hospital Universitario Donostia, Donostia-San Sebastián, Spain.

5. POLYMAT, University of the Basque Country UPV/EHU, Donostia-San Sebastian, Spain.

6. Ceit-IK4, Water & Health Division, Donostia-San Sebastian, Spain.

7. IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain.

Submitted 27 April 2017; Accepted 29 June 2017; Published 11 July 2017

Extreme ecosystems can be a source of untapped microorganisms to produce novel bioactive compounds of industrial interest. Consequently, in this work, 32 actinomycetes were isolated from 6 soil samples collected from Algerian Sahara in searching for untapped producers of novel antimicrobial compounds. All the isolates were further subjected to antimicrobial screening against pathogenic bacteria, yeast and fungi. The obtained results indicated that three of the isolates (named C, MS1 and 10) showed antimicrobial activities against most of the tested pathogenic microorganisms. Therefore, these three promising isolates, previously identified as *Streptomyces* by morphological, biochemical and physiological methods, were selected for their subsequent identification by the whole cell matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis. Thus, the isolates C, MS1 and 10 were identified as *Streptomyces violaceoruber* B263 UFL, *Streptomyces albus* B262 UFL and *Streptomyces badius* B192 UFL, respectively. These results pointed out actinomycetes from Sahara soils as potential sources of novel antimicrobial compounds. Also, MALDI-TOF MS showed to be a robust technique for bacteria identification.

**Key words:** Actinobacteria; antimicrobial activities; MALDI-TOF MS; Sahara soils; strain identification

**A**ctinomycetes are ubiquitous Gram-positive aerobic bacteria which present a wide variety of morphologies and some of them, such as those belonging to the *Streptomyces* genus, resemble the

filamentous fungi (1). The biotechnological interest of these microorganisms resides in their ability to produce different bioactive compounds. In fact, about two-thirds of natural antibiotics have been

\* Corresponding author: Ceit-IK4, Water & Health Division, Donostia-San Sebastian, Spain. Email: srodriguez@ceit.es

isolated from actinomycetes (2,3).

To find novel bioactive compound producers, exploration of ecosystems exposed to extreme environmental conditions is an interesting approach. Hence, research in later years is oriented towards the screening and isolation of actinomycetes from untapped habitats (4). The exploration of such habitats could even provide new taxa which, in turn, could be promising sources of novel bioactive compounds (5-8). In this sense, Algerian Sahara soils, exposed to hard climate conditions, represent particular ecosystems worthy of being explored. In addition, the Algerian Sahara soils have a significant biodiversity (9). Accordingly, the isolation of different actinomycetes strains from Algerian Sahara soils, their antimicrobial activity against pathogenic microorganisms and their characterization via conventional and molecular methods (i.e. MALDI-TOF MS) was investigated.

## Materials and methods

### Sampling

Six soils samples were collected from different Sahara areas in the south of Algeria, about 15 cm below the surface of the soil. All the soil samples were collected randomly, then packed in zipper bags and stored in a refrigerated container (4°C) during transportation to the laboratory.

The samples were air dried and heated aseptically to remove the undesired Gram-negative bacteria. Appropriate selective media such as yeast extract– malt extract agar medium (ISP2) and peptone yeast extract– malt extract agar medium (GLM) supplemented with actidione (5 µg/mL) and rifampicin (5 µg/mL) were used to promote actinomycetes conditions of growth and prevent fungal contamination (10).

### Isolation and maintenance of actinomycetes

Ten-fold serial dilutions of soil samples were done using sterile distilled water. The soil suspensions were plated using ISP2 medium

supplemented with 40 mg/mL of actidione to inhibit the development of eukaryotic microorganisms. The plates were incubated at 30 °C for 7-10 days. Pure colonies were selected by observing the fine filaments around the actinomycete colonies under light microscopy and taken using a sterile inoculation loop. The isolated colonies were maintained on ISP2 agar slants at 4°C for subsequent studies.

### Pathogenic bacteria and yeasts

The pathogenic bacterial strains *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Micrococcus luteus* ATCC 533, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Lococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 43816, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 82827 and *Salmonella enterica* ATCC 14028 and the yeasts *Candida albicans* ATCC 10231 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226 were obtained from the Pasteur Institute in Alger (Algeria). The strains were maintained on Petri plates containing nutrient agar at 4 °C and subcultured every 2 months.

### Pathogenic filamentous fungi

The pathogenic fungi *Fusarium culmorum*, *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* were obtained from the Institute of Phytopathology and Plant Protection of Messerghine in Oran (Algeria). The fungi were maintained on Petri plates containing potato dextrose agar (PDA) at 4 °C and subcultured every 2 months.

### Screening of the actinomycete isolates for antimicrobial activity

Primary screening was performed by the cross streak method against selected fungi and yeasts (11) and secondary screening by the agar cylinder method (12) against selected pathogenic bacteria (13). The isolates showing the highest antimicrobial activity were selected for further studies. The antimicrobial activity was evaluated by:

the cross streak method, measuring the distance of inhibition between the pathogenic bacteria and yeasts after incubation at 30 C for 24 h (Figure 1) and fungi after incubation at 25 C for 48 h (Figure 1).

the agar cylinder method, measuring the inhibition zones around the colony of each isolate after incubation at 30 C for 24 h (bacteria and yeast) and 25 C for 48 h (fungi) (Figure 2).

Percentage of inhibition was calculated using the following formula (14).

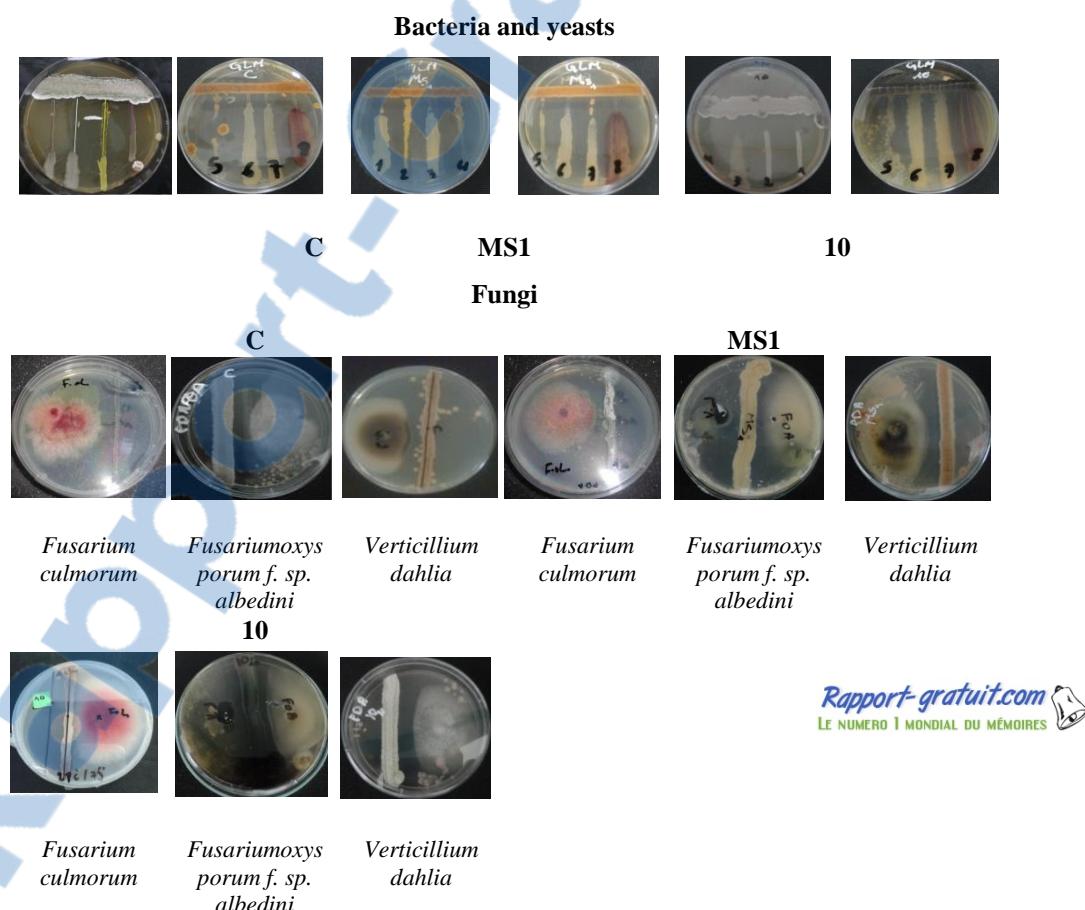
(%)inhibition=(Rcontrol-Rtest)/Rcontrol x100  
where Rtest is the colony diameter of the pathogenic fungus with actinomycete isolates on PDA plates and Rcontrol is the colony diameter of the pathogenic fungus on PDA plates.

The degree of antimicrobial activity of the isolates is classified depending on the mean diameter of the inhibition zone of inhibition. In the present case, the diameter of the zone of inhibition was divided as follows: excellent activity ( $\geq 18$  mm), good activity (12-15 mm), moderate activity (10-12 mm) and weak activity ( $\leq 9$  mm). Triplicate samples were performed.

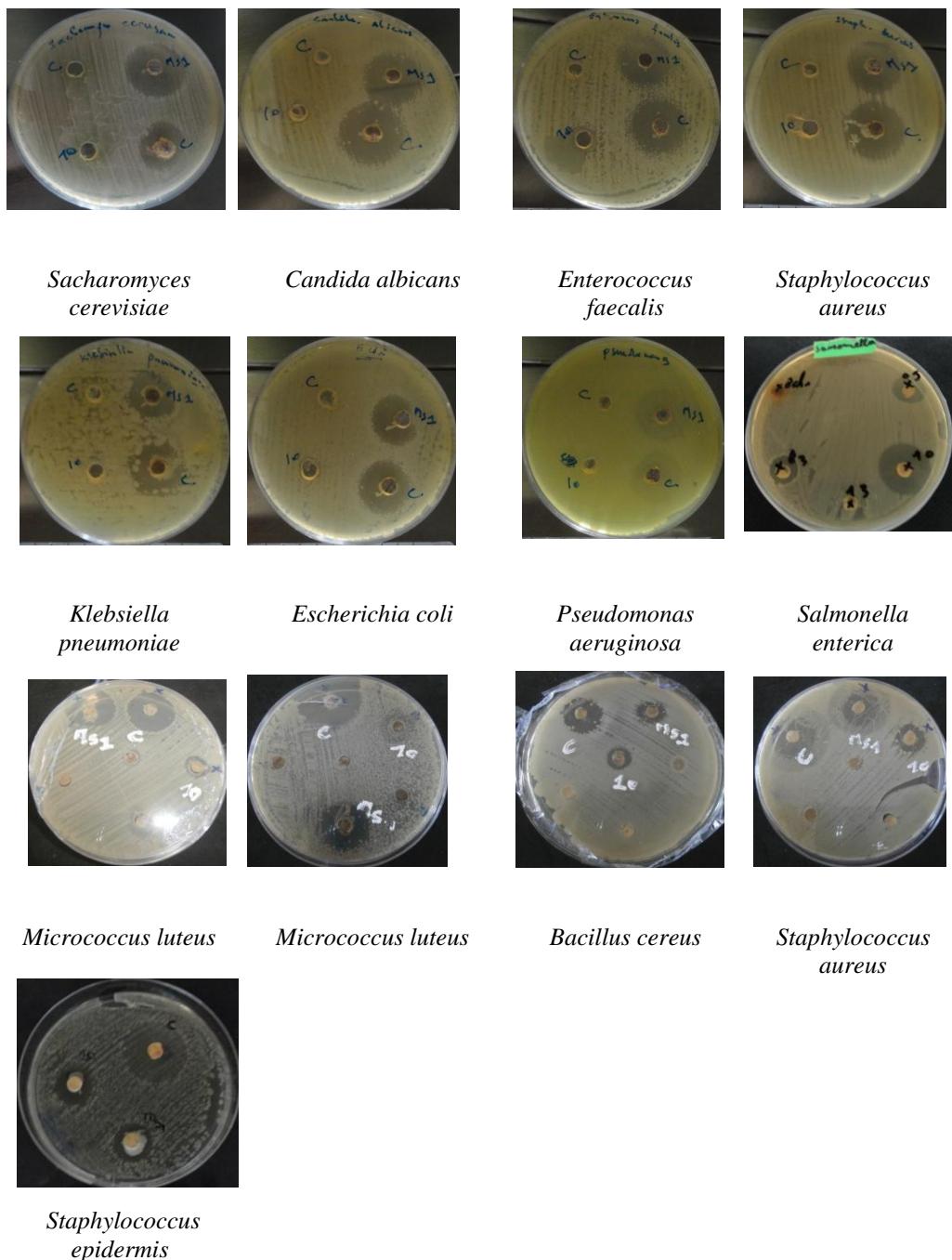
#### Characterization of the actinomycete isolates

The isolates showing antimicrobial activity were characterized morphologically, biochemically and physiologically following the methods given in the International Streptomyces Project (ISP) (15).

Color determination was carried out using ISCC-NBS colour charts (16). The micromorphology of the strains was observed by



**Fig. 1. Cross streak method of the isolates C, MS1 and 10 against different pathogenic bacteria, and fungi.** Pathogenic bacteria tested were 1: *Bacillus cereus*; 2: *Micrococcus luteus*; 3: *Enterococcus faecalis*; 4: *Staphylococcus aureus* ATCC 44300; 5: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 6: *Staphylococcus epidermidis*; 7: *Escherichia coli*; 8: *Klebsiella pneumoniae*. Pathogenic fungi were: F. c.: *Fusarium culmorum*; F. o. a.: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedini*; V. d: *Verticillium dahliae*.



**Fig. 2.** Antimicrobial activity of isolates C, MS1 and 10 against different pathogenic bacteria and yeasts.

light microscopy after incubation at 30 °C for 2 weeks on petri plates containing ISP2 medium. The pigmentation of the aerial mycelium and the structure of sporophores, which are highly characteristic and useful in the classification of actinomycetes, were observed by cultivating the strains on different ISP media (i.e. yeast extract-malt extract

agar (ISP2), oatmeal agar (ISP3), inorganic salts-starch agar (ISP4), glycerol-asparagine agar (ISP5), nutrient agar and Bennett medium). The arrangement of spores and sporulating structures was examined microscopically using the cover slip culture method by inserting a sterile cover slip at an angle of 45 °C in starch casein agar medium (17,18).

A loopful of each isolate was taken from a 7-day old culture, inoculated at the insertion place of the cover slip and incubated at 30 C for 7 days. The cover slip was carefully removed using a sterile forceps and placed upwards on a clean glass slide. The bacterial growth on the cover slip was fixed with a few drops of absolute methanol for 15 min, washed with tap water and then flooded with crystal violet reagent for 1 min followed by washing and blot drying. Finally, the cover slip was examined under microscope using oil immersion lens (100X). Biochemical and physiological characterization of the isolates were performed by streaking them on starch agar plates and incubating them at 30 C for 7 days. After incubation, iodine solution was poured onto the agar and examined for hydrolysis of starch by the production of a clear zone around the microbial growth. Furthermore, the isolates were streaked on gelatine agar plates and incubated at 30 C for 7 days to test for gelatine hydrolysis. After incubation, the plates were flooded with 1 mL of mercuric chloride solution and the diameters of the hydrolyzed zones around the colonies were measured. Also, the isolates were streaked on plates containing skimmed milk agar medium, incubated at 30 C for 7 days and the diameters of the hydrolyzed zones around the colonies were measured. To test sodium chloride resistance, starch casein agar was prepared in three batches and supplemented with 5%, 7% and 10% (w/v) sodium chloride. The medium was autoclaved, poured onto Petri plates and allowed for solidification. Then, the plates were streaked with the isolates and incubated at 30 C for 7 days. Visual observations were done to record the growth of the isolates. Finally, the isolates were streaked on starch casein agar plates and incubated at 25 C, 30 C, 35 C, and 40 C for 7 days. The optimum temperature for maximum growth was determined through visual examination (19).

#### **MALDI- TOF MS identification of the actinomycetes isolates**

The identification of the actinomycete isolates C, MS1 and 10 by MALDI-TOF MS was performed on a Bruker Microflex system (Bruker, Germany) instrument equipped with a nitrogen laser with an output wavelength of 337 nm used at a repetition rate of 60 Hz. All spectra were acquired in the linear positive mode within a range of 2-20 kDa.

A rapid, on-plate method was used for sample preparation. This method requires a small amount of bacteria which was picked up with a sterile toothpick from the bacteria colony and hand spotted onto a 96-spot polished stainless steel MALDI target plate. The spots were allowed to dry at room temperature and overlaid with 1  $\mu$ L of MALDI matrix  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA). CHCA was dissolved in a solvent (acetonitrile 50%, water 47.5% and trifluoroacetic acid 2.5%) to a final concentration of 2.5 mg/mL. When the matrix was air dried, the MALDI sample plate was inserted into the spectrometer and spectra were acquired under high vacuum conditions.

MALDI-Biotyper 3.1 software, library version V4.0.0.1 (5.627 MSPs) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) was used for the identification of each bacteria. This software allows discovering bacteria's identity by its own unique molecular composition, revealing a characteristic peak pattern, even for reliable differentiation of species: the individual fingerprint. The molecular fingerprint is used for pattern matching. Sophisticated recalibration and statistical algorithms allow robust and accurate identification. Matching scores supported by color codes are used for ranking the results. MALDI Biotyper integrates a ready to-use reference library comprising thousands of individual species and is growing continuously. The identification of unknown bacteria was performed by comparing their spectral fingerprints with those existing in the database (composed for 5627 entries). A matching score based on identified masses and their intensity correlation was generated and used for ranking the results.

Biotyper 3.1 software (Bruker), returned the top 10 identification matches along with confidence scores ranging from 0.0 to 3.0. Estimated values of 2.3 or higher were considered high-confidence scores and indicate that of genus and species identifications is reliable (secure species), score values between 2.0 and 2.29 show that the genus is reliable and the species is probable. Score values between 1.7 and 1.99 were considered intermediate confidence and indicate that the identification of genus was probable. Score values lower than 1.7 were considered “not reliable” evincing that spectra acquisition was insufficient or no peak protein was detected, and further analysis is required for this sample.

#### **Production, extraction, and detection of antimicrobial compounds**

Each isolate of actinomycetes was cultivated in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of ISP2 medium (1% malt extract, 0.4% yeast extract, 0.4% glucose, pH 7.2). The flasks were incubated at 30 °C for 5 days on an orbital shaker (250 rpm). After that, the culture broth was centrifuged for 20 min at 8000×g to remove the mycelium. The supernatant was divided into 4 equal volumes (60

mL each) and extracted with 60 mL of an organic solvent. Four different organic solvents ranging from non-polar to polar ones were screened for effectiveness, including n-hexane, dichloromethane, n-butanol and ethyl acetate. The organic phases of strains C and MS1 and the aqueous phase of strain 10 were evaporated to dryness using a Rotavapor (Laborota 4000). To select the best extraction solvents, according to their quantity and antimicrobial activity, the activities of each crude extract of the selected isolates (i.e. C, MS1 and 10) were examined. Briefly, each crude extract was defatted with 1 mL of methanol and subjected to biological assay (disc of 6 mm in diameter, Pasteur Institute) against *Micrococcus luteus* (60 µL per disc) (data not shown). The solvents which gave the highest inhibition diameter were then used for the extraction of the active substances (20).

To test the antimicrobial activities of each crude extract, the agar well-diffusion method on Muller Hinton medium (MHA) was performed. For this, a volume of 25 µL of the crude extract of each strain (i.e. MS1, C and 10) was carefully dispensed into each well, allowed to diffuse for 2 h at 4 °C and incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the

**Table 1.** Antimicrobial activity of strains C, MS1 and 10

<b>Test organisms</b>	<b>Inhibition zone (mm)</b>		
	<b>C</b>	<b>MS1</b>	<b>10</b>
<b>Gram-positive bacteria</b>			
1. <i>Bacillus cereus</i>	21	14	15
2. <i>Micrococcus luteus</i>	28	35	22
3. <i>Enterococcus faecalis</i>	20	20	13
4. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 44300	20	19	21
5. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21	22	20
6. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	22	18	13
<b>Gram-negative bacteria</b>			
7. <i>Escherichia coli</i>	19	19	22
8. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	20	22
9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	18	20
10. <i>Salmonella enteric</i>	11	15	21
<b>Yeasts</b>			
11. <i>Candida albicans</i>	18	20	16
12. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17	20	11
<b>Filamentous fungi (%) of growth inhibition</b>			
13. <i>Fusarium culmorum</i>	36	38	32
14. <i>Verticillium dahliae</i>	34	35	40
15. <i>Fusarium oxysporum f. sp. albedinis</i>	39	35	37

\*The values are the mean of triplicate samples with a standard deviation less than 10%

**Table 2.** Culture characteristics of strains C, MS1 and 10 on different media

Medium	Growth			Spore colour			Vegetative mycelium			Soluble pigment		
	C	MS1	10	C	MS1	10	C	MS1	10	C	MS1	10
ISP2	+++	+++	+++	Grey	Grey	Yellowish grey	Pale yellow	Blue violet	Brilliant orange yellow	- -	+Dark green	
ISP3	+	+	+	Grey white	Grey white	Yellowish Gray	Pale yellow	Blue violet	Brilliant orange yellow	- -	-	
ISP4	++	++	++	White	White	Yellowish Gray	Pale yellow	Blue violet	Brilliant orange yellow	- -	-	
ISP5	+	+	+	Grey	Grey	Yellowish Gray	Pale yellow	Blue violet	Brilliant orange yellow	- -	-	
Nutrient agar	+	+	+	Grey white	Grey white	Yellowish Gray	Pale yellow	Blue violet	Brilliant orange yellow	- -	-	
Benett medium	+++	+++	+++	Grey white	Grey white	Yellowish Gray	Pale yellow	Blue violet	Brilliant orange yellow	- -	+Dark green	

ISP: International *Streptomyces* Project; ISP2: yeast extract—malt extract agar medium; ISP3: oatmeal agar medium; ISP4: inorganic salts—starch agar medium; ISP5: glycerol—asparagine agar medium.

zone of inhibition (in mm) around each well was recorded.

## Results

### Actinomycetes isolation

Among the 32 actinomycetes isolated from Sahara soils, 13 isolates showed antibacterial activities against at least one of the pathogenic bacteria by the cross streak method as primary screening and the agar cylinder method as secondary screening. The results revealed that isolates C, MS1 and 10 exhibited broad spectrum activities against pathogenic bacteria (Gram-positive and Gram-negative), especially against *M. luteus*, *S. aureus* and *S. epidermidis*. Anti-yeast activity was also recorded against *S. cerevisiae* and *C. albicans*, whereas the antifungal activity was moderate (Table 1).

### Morphological, biochemical and physiological characterization of the isolates

Colonies of strains C, MS1 and 10 grew well on most of the organic media used and were convex and smooth. The aerial mycelium was grey for strains C and MS1 and yellowish grey for strain 10. The substrate mycelium was pale yellow for strain MS1, blue violet for strain C and brilliant orange yellow for strain 10 (<http://people.csail.mit.edu/jaffer/Color/Dictionaries>). Abundant dark green diffusible pigments were formed only on ISP2 and Bennett media for the strain 10. The cultural characteristics of the isolates are given in details in Table 2.

The isolates were able to hydrolyze a great number of compounds such as casein, arabinose, fructose, galactose, glucose, mannitol and xylose. They were resistant to sodium azide (0.05 g/L), crystal violet (0.05 mg/mL) and several antibiotics such as ampicillin (20 mg/L), kanamycin (25 mg/L) and tetracycline (30 mg/L). The optimum growth temperature of most isolates was between 25 and

**Table 3.** Physiological and biochemical properties of strains C, MS1 and 10

Property	Isolates		
	C	MS1	10
Melanin formation (ISP6 and ISP7)	-	++	++
Starch hydrolysis (tryptone soya agar medium)	++	++	++
Casein hydrolysis (casein agar medium)	++	++	++
Urease production (nitrate peptone broth medium)	++	+	++
Gelatine hydrolysis (nutrient gelatine medium)	-	-	-
Soluble pigment production (ISP media)	-	-	++ Green
H <sub>2</sub> S production (triple sugar iron agar medium)	+	+	+
pH range of growth (ISP4) 6 - 9	+	+	++
Temperature range of growth (ISP4) 25-45 C	+	+	+
Antibiotic resistance			
Ampicillin (20 mg/L)	R	R	R
Kanamycin (25 mg/L)	S	S	S
Tetracycline (30 mg/L)	R	R	R
Chloramphenicol (25 mg/L)	R	S	S
Chlortetracycline hydroxychloride (30 mg/L)	S	S	S
NaCl tolerance			
NaCl (5% (ISP4)	++	++	++
NaCl 7% (ISP4)	+	+	+
NaCl 10% (ISP4)	-	-	-
Sporophore morphology			
Straight	-	-	-
Spiral	++	++	++
Flexous	-	-	-
Retinaculum apertum	+	-	-
Growth on inhibitory compounds			
Phenol 0.1% (ISP4)	-	-	-
Lysozyme 0.005% (ISP4)	-	-	-
Sodium azide 0.01% (ISP4)	-	-	ND
Crystal violet 0.05% (ISP4)	-	-	-

ISP: International Streptomyces Project; ISP4: inorganic salts-starch agar medium; ISP6: peptone-yeast extract-iron agar medium; ISP7: tyrosine agar medium. +: Growth; -: no growth; ND: not determined. R: Resistant, S: Susceptible.

30°C, growth being inhibited at temperatures above 40°C (Table 3).

#### **Identification of the isolates by MALDI-TOF MS analysis**

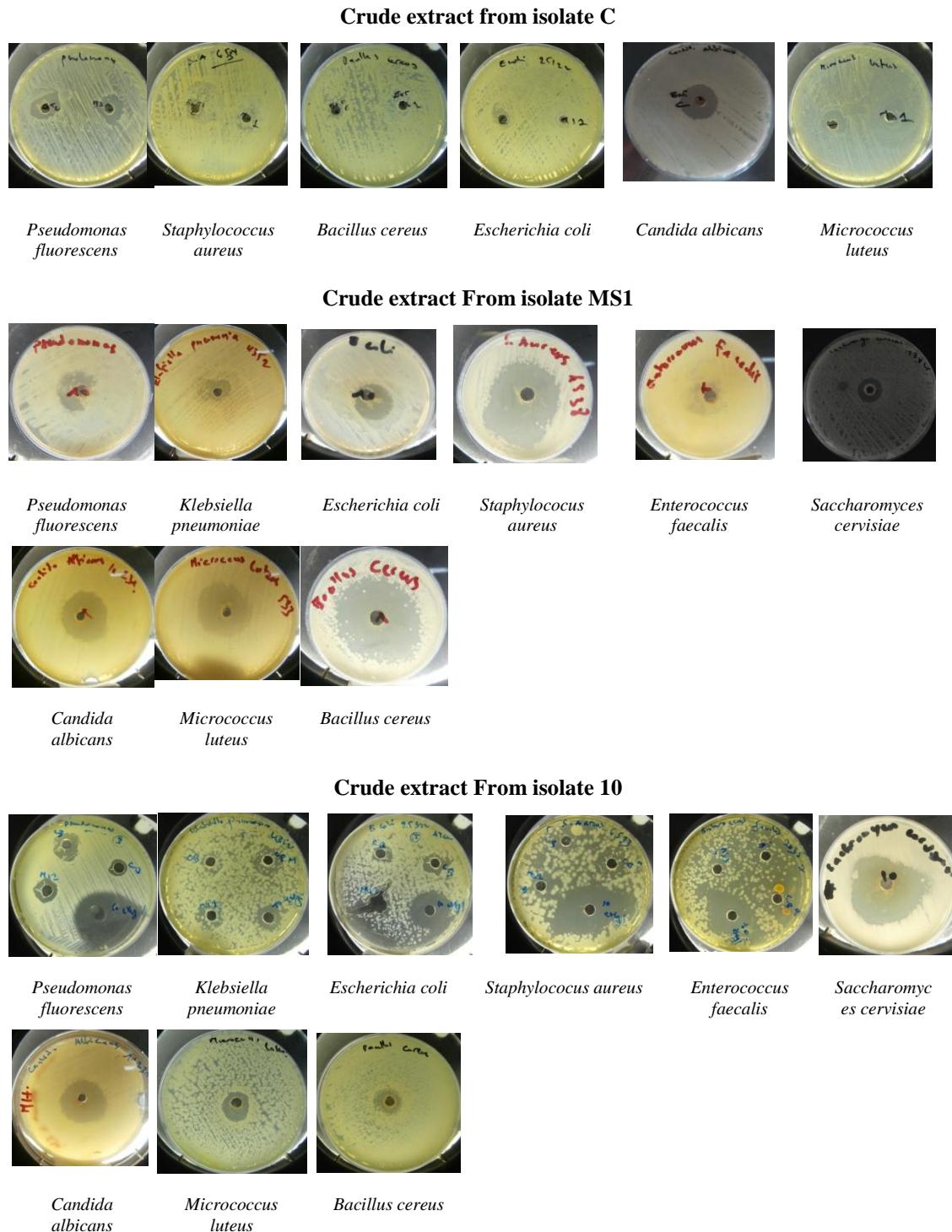
The three isolates C, MS1 and 10 were identified by MALDI-TOF MS as *Streptomyces violaceoruber* (NCBI code 1935, score 1.912), *Streptomyces albus* (NCBI code 1888; score 1.261) and *Streptomyctete badius* (NCBI code 1941; score 1.514), respectively. The first one presented high score and the third one was acceptable. Nevertheless, the second one did not present a high score by MALDI-TOF MS analysis, but with the additional information given by the morphological,

physiological, biochemical and cultural characteristics tests, we concluded that it was very likely that strain.

#### **Antimicrobial activity of the crude extract of the isolates**

The crude extract of isolate C after fermentation in ISP2 medium was tested by the well diffusion method on MHA. The results revealed that the maximum zone of inhibition was recorded against *C. albicans* (17 mm) followed by *M. luteus* (15 mm) and *K. pneumoniae* (15 mm) (Table 4; Figure 3). For strain MS1, its crude extract was also active against bacteria and fungi but much less active than strain C, with

maximum inhibition zone obtained against *M. luteus* (18 mm) and *P. fluorescens* (15 mm) (Table 4; Figure 3). The strain 10 exhibited an antimicrobial activity higher than strains C and MS1, especially against *P. fluorescens* (36 mm), *S. aureus* (35 mm), *S. epidermidis* (35 mm), *E. coli* (34 mm) and *C. albicans* (31 mm) (Table 4; Figure 3).



**Fig. 3.** Antimicrobial activity of the crude extract of the isolates C, MS1 and 10 against different pathogenic bacteria and yeasts.

**Table 4.** Zone of inhibition (mm) of crude extracts produced by strains C, MS1 and 10 on ISP2 (International Streptomyces Project yeast extract—malt extract agar) medium using the well diffusion method.

Test organisms	Inhibition zone (mm)		
	Strain C	Strain MS1	Strain 10
<b>Gram-positive bacteria</b>			
<i>Bacillus cereus</i>	14	11	---
<i>Micrococcus luteus</i>	15	18	---
<i>Enterococcus faecalis</i>	13	---	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	12	35
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	---	35
<b>Gram-negative bacteria</b>			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12	15	36
<i>Escherichia coli</i>	14	10	34
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	---	14
<b>Yeasts</b>			
<i>Candida albicans</i>	17	12	31
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13	---	12

\*The values are the mean of triplicate samples with a standard deviation less than 10%. †---: no inhibition

## Discussion

The increased emergence of multidrug resistant organisms makes the treatment of numerous infectious diseases difficult. Hence, the development of novel effective drugs against the abovementioned organisms is needed. For this, the exploration of untapped and extreme habitats can lead to the isolation of novel microorganisms to produce novel bioactive compounds, recently several researchers have shown the potential of extreme habitats as reservoirs of promising antimicrobial compounds producers (4,7,21, 22-26).

Taking into account the results exposed above, the isolation of microorganisms with promising antimicrobial activities from Algerian Sahara soils as a model of an extreme ecosystem was pursued. Among the 32 actinomycetes isolated from Algerian Sahara soils, 3 of them (named as C, MS1 and 10) exhibited broad spectrum antimicrobial activities against different pathogenic bacteria, yeasts and even fungi. These C, MS1 and 10 isolates were identified by combining the results obtained via conventional and molecular methods, as *Streptomyces violaceoruber*, *Streptomyces albus* and *Streptomyces badius*, respectively. This is not

surprising since *Streptomyces* is the most common genus in the actinomycetes order (27). Our results are in agreement with those reported by Kumar et al. (28). As a consequence, they found that *Streptomyces* was the predominant genus in the *actinomycete* strains isolated from soil samples of the Uttarakhand state (India).

The isolated strains (i.e. C, MS1 and 10) are potential producers of bioactive compounds as shown in the antimicrobial activities of their crude extracts against different pathogenic microorganisms (Table 4; Figure 3). These results are in agreement with those reported by different researchers. As a result, Arumugam et al. (24) found that the most common soil bacteria actinobacteria isolated from soil samples of a mangrove forest in India exhibited antimicrobial activity and antibiotic production. Moreover, Elbendary et al. (29) reported antimicrobial activity form actinobacteria isolated from farm soils in Egypt. Besidess, *S. albus* G was reported to produce an antibiotic compound (30), *S. violaceoruber* VLK-4 , isolated from soil samples in India, was shown to produces antimicrobial compound (31) and a bioactive

compound was isolated from the culture broth of a *S. badius* strain isolated from Egyptian soil (32).

Strain 10 exhibited an antimicrobial activity higher than strains C and MS1, especially against *P. fluorescens* (36 mm), *S. aureus* (35 mm), *S. epidermidis* (35 mm), *E. coli* (34 mm) and *C. albicans* (31 mm) (Table 4; Figure 3). These differences can be attributed to their different chemical structures, disintegration during the extraction process (21) and environmental factors (temperature and pH of the crude extract).

It is worthy to mention that the crude extracts from the isolates showed antimicrobial activity against Gram-negative bacteria since, in general, they are more resistant to antimicrobial compounds than the Gram-positive bacteria (29). Lee et al. (33) also reported inhibitory activity against Gram-negative bacteria for actinomycetes isolated from soil samples of the Tanjung Lumpur mangrove forest in Malaysia. On the contrary, Rabia-Boukhalfa et al. (25) detected no activity against Gram-negative bacteria by a halotolerant actinobacterium, belonging to the genus *Nocardiopsis*, isolated from a salt lake soil sample in the Algerian Sahara.

The obtained results point out actinomycetes from Algerian Sahara soils as potential sources of novel antimicrobial compounds. Future research will be required to identify the produced antimicrobial compounds which will involve their purification and the use of different chemical analysis such as HPLC-MS, FTIR and NMR techniques. On the other hand, MALDI-TOF MS has shown to be a fast, reliable and highly robust technique for bacteria identification.

#### Acknowledgement

The authors thank Ane Aguirre Emazabel (Osakidetza's technician) for her help in MALDI-TOF MS characterization.

#### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest.

#### References

- Ronald M. Principles of microbiology. New York: WCB McGraw-Hill; 1997.
- Buckingham J. Dictionary of Natural Products, Supplement 4: Taylor & Francis; 1997.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003;66:1022-37.
- Singh LS, Sharma H, Talukdar NC. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiol* 2014;14:278.
- Aguilar A. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews* 1996;18:89-92.
- Bouras N, Mathieu F, Sabaou N, et al. Effect of amino acids containing sulfur on dithioliopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J Appl Microbiol* 2006;100:390-7.
- Boubetra D, Zitouni A, Bouras N, et al. *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:549-53.
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, et al. *Actinopolyspora saharensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil of Algeria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2013;103:771-6.
- Sabaou N, Boudjella H, Bennadji A. Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse* 1998;9:147-53.
- Cuesta G, Garcia-de-la-Fuente R, Abad M, et al. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *J Environ Manage* 2012;95 Suppl:S280-4.
- Lemos ML, Toranzo AE, Barja JL. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microb Ecol* 1985;11:149-63.
- Audrey W. Disk Diffusion Test and Gradient Methodologies. In: Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC, editors. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*: Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group; 2007. p. 53-72.
- Taechowisan T, Lu C, Shen Y, et al. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and

## Algerian Sahara Actinomycetes with Antibacterial Activities

- their antifungal activity. *Microbiology* 2005;151:1691-5.
14. Wang SL, Hsiao WJ, Chang WT. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *J Agric Food Chem* 2002;50:2249-55.
  15. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1966;16:313-40.
  16. Kelly LK. Central notations for the revised iscc-nbs color-name blocks. *J Res Natl Bur Stand* 1958;61:427-31.
  17. Williams STaC, T. *Actinomycetes*. In: Booth C, editor. *Methods in Microbiology*. London: Academic Press 1971.
  18. Kuester E, Williams ST. Selection of Media for Isolation of *Streptomyces*. *Nature* 1964;202:928-9.
  19. Muir WM, Mutitu EW, Mukunya DM. Identification of selected actinomycetes isolates and characterization of their antibiotic metabolites. *J Biol Sci* 2008;8:1021-6.
  20. Mertz FP, Yao RC. *Streptosporangium carneum* sp. nov. isolated from soil. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:247-53.
  21. Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, et al. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3:426-35.
  22. Rashad FM, Fathy HM, El-Zayat AS, et al. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol Res* 2015;175:34-47.
  23. Saker R, Meklat A, Bouras N, et al. Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. *Annals of Microbiology* 2015;65:2241-53.
  24. Arumugam T, Senthil Kumar P, Kameshwar R, et al. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. *Microb Pathog* 2017;107:225-33.
  25. Hadj Rabia-Boukhalfa Y, Eveno Y, Karama S, et al. Isolation, purification and chemical characterization of a new angucyclinone compound produced by a new halotolerant *Nocardiopsis* sp. HR-4 strain. *World J Microbiol Biotechnol* 2017;33:126.
  26. Shaik M, Girija Sankar G, Iswarya M, et al. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 2017;15:87-94.
  27. Taddei A, Rodriguez MJ, Marquez-Vilchez E, et al. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: morphological and biochemical studies. I. *Microbiol Res* 2006;161:222-31.
  28. Kumar V, Bisht GS, Gusain O. Terrestrial actinomycetes from diverse locations of Uttarakhand, India: Isolation and screening for their antibacterial activity. *Iran J Microbiol* 2013;5:299-308.
  29. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010;2:a000414.
  30. Majer J, Chater KF. *Streptomyces albus* G produces an antibiotic complex identical to paulomycins A and B. *J Gen Microbiol* 1987;133:2503-7.
  31. Naragani K, Munaganti RK, Sirigiri CK. Antimicrobial Potential of *Streptomyces violaceoruber* VLK-4 Isolated from South Coast of Andhra Pradesh, India. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2014;25:125-29.
  32. El Sayed OH, Asker MMS, Swelim MA, et al. Production of hydroxy marilone C as a bioactive compound from *Streptomyces badius*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 2016;14:161-8.
  33. Lee LH, Zainal N, Azman AS, et al. Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:698178.

## Résumé

Ce travail consiste à apporter une contribution à l'étude du pouvoir antimicrobien de certaines actinobactéries ayant la capacité à inhiber la croissance des microorganismes pathogènes et par conséquent la recherche du composé actif au sein de leurs métabolites. Trente-deux (32) isolats d'actinobactéries ont été collectés à partir de six échantillons de sol, provenant de différentes régions d'Algérie. L'étude de l'activité antimicrobienne de ces isolats vis-à-vis de bactéries pathogènes Gram positif et Gram négatif, levures et champignons phytopathogènes par les techniques de stries croisées et des cylindres d'agar ont permis de sélectionner quatre isolats ayant une activité non négligeable : MS1, 10, C et D2. L'isolat D2 a présenté le plus important pouvoir inhibiteur antibactérien en particulier vis-à-vis des souches indicatrices *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus pneumoniae*, dont la zone d'inhibition peut atteindre 30 mm de diamètre. La molécule antimicrobienne de cet isolat a été extraite puis purifiée en utilisant différents solvants d'extraction dont l'acétate d'éthyle s'est révélé le meilleur solvant d'extraction. L'extrait brut a été testé sur plusieurs souches pathogènes y compris *S. aureus* afin d'étudier son spectre d'action. Le composé est ensuite purifié par CCM et HPLC semi préparative. La fraction active obtenue a été analysée par la méthode spectrométrique de masse ESI-Mass en mode positif et en mode négatif. En se référant à la base de données Streptome DB et selon la masse moléculaire et les propriétés de la molécule bioactive de l'isolat sélectionné, cette molécule semble être très proche des molécules 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3- (4-métilpentanoil) de phénanthrène-9,10-dione et Galvaquinone A avec quelques différences. Ce résultat laisse supposer qu'il s'agissait probablement d'un dérivé de l'une de ces molécules ou bien d'une nouvelle molécule. Les résultats de l'étude taxonomique, basés sur les caractères phénotypiques et phylogénétiques ont montré que l'isolat D2 est très proche génétiquement de *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877.

## Mots clés :

Actinobactéries; Molécules bioactives; *S. ambofaciens*; Sols; Activité antimicrobienne; Etude taxonomique; Séquençage de génome; *Staphylococcus aureus*; Aride et semi aride; Galvaquinone A.