

République Algérienne Démocratique et Populaire.
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.
Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
Département de Biologie Physico-Chimique.

Mémoire
En vue de l'obtention du diplôme de
Magister
En Biologie
Option : Biologie Moléculaire

Thème :

**Sélection d'actinomycètes halotolérants producteurs de
substances antimicrobiennes**

Présenté par : Adrar Nassim Salem.

Devant le jury :

M ^{me} Sadoun Djamila	Professeur (UAM Bejaia)	Présidente
M ^f Benallaoua Said	Professeur (UAM Bejaia)	Rapporteur
M ^f Kecha Mouloud	M. conférences (UAM Bejaia)	Co rapporteur
M ^{me} Bedjou Fatiha	M. conférences (UAM Bejaia)	Examinatrice
M ^f Touati Aziz	M. conférences (UAM Bejaia)	Examineur

2009

République Algérienne Démocratique et Populaire.
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.
Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
Département de Biologie Physico-Chimique.

Mémoire
En vue de l'obtention du diplôme de
Magister
En Biologie
Option : Biologie Moléculaire

Thème :

**Sélection d'actinomycètes halotolérants producteurs de
substances antimicrobiennes**

Présenté par : Adrar Nassim Salem.

Devant le jury :

M ^{me} Sadoun Djamila	Professeur (UAM Bejaia)	Présidente
M ^f Benallaoua Said	Professeur (UAM Bejaia)	Rapporteur
M ^f Kecha Mouloud	M. conférences (UAM Bejaia)	Co rapporteur
M ^{me} Bedjou Fatiha	M. conférences (UAM Bejaia)	Examinatrice
M ^f Touati Aziz	M. conférences (UAM Bejaia)	Examineur

2009

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- à mes très chers parents, frères et sœurs, grand-mère Fatima, oncle Mohamed.
- à la mémoire de mes très chers grand-père Moussa et grand-mère Tirbah.
- à Riad, à ma tante Tassadith et à toute ma grande famille.
- à A/Hakim et à tous mes amis.
- à tous ceux qui m'ont aidé.
- à tous mes enseignants.

Remerciements

Ce modeste travail a été réalisé sous la direction du professeur Benallaoua. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de m'encadrer ; accueilli dans le laboratoire dont il est responsable ; pour les connaissances qu'il m'a prodigué durant mon stage pratique, pendant l'année théorique et en tant qu'enseignant de microbiologie générale; pour sa compréhension ; sa patience ; sa volonté de m'aider ; sa gentillesse ; ses précieux conseils ; ses encouragements ; de m'avoir consacré beaucoup de son temps précieux pour corriger ce modeste exposé ; pour la documentation ; le matériel ; les produits ; les boîtes de Pétri et pour toute son aide inestimable ; je lui exprime toute ma reconnaissance, mes remerciements les plus vifs et mes salutations respectueuses.

Je remercie infiniment Docteur Kecha, maître de conférences à l'université de Bejaia, pour avoir accepté de m'encadrer ; pour les connaissances qu'il m'a prodigué ; sa compréhension ; sa patience ; sa volonté de m'aider ; sa gentillesse ; ses précieux conseils ; ses encouragements ; de m'avoir consacré beaucoup de son temps précieux pour corriger ce modeste exposé ; pour sa thèse de Magister ; le matériel ; les produits ; les deux souches d'actinomycètes S15 et S25 ; et pour toute son aide inestimable ; je lui exprime ma profonde gratitude et mes salutations respectueuses.

Je remercie infiniment les membres du jury pour avoir bien voulu examiner ce modeste travail et m'avoir fait l'honneur de faire partie du jury. Qu'ils reçoivent ici l'expression de ma vive gratitude et mes salutations respectueuses :

- Professeur Sadoun pour avoir bien voulu me faire l'honneur de présider le jury, et pour avoir accepté de me signer les autorisations d'effectuer des manipulations dans le laboratoire après les horaires de travail, les week end et les jours fériés.
- Docteur Bedjou, maître de conférences à l'université de Bejaia, pour avoir accepté de se joindre au jury, et pour les connaissances qu'elle m'a prodigué durant les TP de microbiologie générale, et en tant qu'enseignante de pharmacotoxicologie et d'immunologie moléculaire.
- Docteur Touati, maître de conférences à l'université de Bejaia, pour avoir accepté de participer au jury, pour les connaissances qu'il m'a prodigué durant mon stage pratique, ses précieux conseils, sa gentillesse et pour son aide inestimable.

J'exprime toute ma gratitude et mes meilleurs remerciements aux membres du conseil scientifique, à tous ceux qui m'ont donné la chance pour poursuivre ce modeste travail, et à l'administration à leur tête monsieur le Doyen de la faculté entre autres pour avoir accepté de me signer les autorisations d'effectuer des manipulations dans le laboratoire après les horaires de travail, les week end et les jours fériés.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude et mes meilleurs remerciements à :

- Hebbal H., Belhadi D., Sebane H. et Haddad N. pour leur aide inestimable notamment durant les premiers jours de mon stage pratique.

- Benaouadia L., Ladjouz R., Bachir bey M., Bouderies H., Djoudi F. pour leurs précieux conseils et pour toute leur aide.

- Souagui S., Yenat B., Djini I., Bekka F., Keramene B. pour leur gentillesse et leur aide inestimable.

- Abderrahim, M^{me} Garout, M^{me} et M^r Nabti, M^{me} Kiramane ainsi qu'à sa collègue de l'ENS Kouba, Berboucha, Ayouni, Bendali, Khaled khodja, Tacherfout, Tiab, Hammam, Tahiri, Bougoufa, Boukerois, Bribi, M^r Debache, M^r Imadalou, M^r Amrouche, M^r Derahi, pour leur soutien, leur gentillesse et pour toute leur aide.

- Tous les enseignants de l'année théorique de Magister, à tous les chercheurs du LMA/BM et à tous mes enseignants du primaire à ce jour.

- Tous les étudiants de fin de cycle que j'ai rencontré durant mon stage pratique notamment M^{elle} et M^r Alouache et M^r Belhatri.

- Mes très chers parents, frères et sœurs, oncle Mohamed, grand-mère Fatima pour leur sacrifice, leur soutien, leur gentillesse et pour leur aide inestimable.

- A/Hakim, Riad, et à d'autres membres de ma grande famille, ainsi qu'à d'autres amis pour leur soutien, leur gentillesse et pour toute leur aide.

Quelques pages ne suffiront jamais à remercier tous ceux qui m'ont aidé je préfère alors ne donner que le titre d'une immense encyclopédie de remerciements qui est : « Je remercie tous ceux qui m'ont aidé depuis ma naissance à ce jour notamment ceux qui m'ont aidé sans que je le sache ou qui ont incité d'autres à m'aider ». Je dis à toutes ces personnes : « s'il vous plait, acceptez mes meilleurs remerciements, l'expression de ma vive gratitude et mes salutations respectueuses »

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Système de classification hiérarchique proposé de la classe Actinobacteria basé sur les analyses phylogénétiques des données de la séquence ADNr/ARNr 16s (Stackebrandt et al., 1997)	13
2	Le cycle de vie de <i>Streptomyces coelicolor</i> (Kieser et al., 2000)	17
3	Photographie de la souche B sur le milieu nitrate amidon à 5% de NaCl	32
4	Photographie de la souche B sur milieu nitrate amidon à 5% de NaCl vu de dessous [après un mois d'incubation (mycélium de substrat)]	32
5	Photographie de la souche R sur le milieu nitrate amidon à 5% de NaCl	33
6	Apparence du MV et du MA de la souche OG (milieu nitrate amidon, 5% de NaCl)	33
7	Apparence du MA et du MV de la souche S25 sur le milieu ISP1 (pH=7,2, 0% de NaCl)	34
8	Apparence du MA et du MV de la souche S15 sur milieu M2 (7,5g/l de NaCl)	34
9	Couleur du milieu nitrate amidon (5% de NaCl, après environ 30 jours d'incubation)	35
10	Couleur du milieu nitrate amidon (5% de NaCl, après environ 15 jours d'incubation)	35
11	Dégradation de la caséine par l'actinomycète R	39
12	Dégradation de la caséine par l'actinomycète OG	40
13	Activité antimicrobienne de l'actinomycète R vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i>	47
14	Résultat du test des stries croisées de l'actinomycète B vis-à-vis de germes cibles fongiques et d'une levure	48
15	Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique du mycélium de l'actinomycète B vis-à-vis d' <i>Aspergillus niger</i>	48
16	Activité antimicrobienne de l'actinomycète S15 vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i>	49
17	Activité antimicrobienne de l'actinomycète S25 vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i>	49
18	Activité antifongique de l'extrait méthanolique du mycélium de l'actinomycète OG vis-à-vis de <i>Mucor ramanianus</i>	50
19	C.C.M réalisée pour l'étude de la présence de sucres caractéristiques (système éluant : n-butanol- eau distillée- pyridine- toluene (10 :6 :6 :1, vol/vol))	52
20	C.C.M ascendante pour la mise en évidence de l'acide diaminopimélique et de la glycine (système éluant : méthanol- eau distillée- HCl 6N- pyridine (80 :26 :4 :10, vol/vol))	53

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Zitouni, 2005)	4
2	Fréquence de divers genres d'actinomycètes dans le sol. D'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents (selon Lechevalier et Lechevalier, 1967) (Theilleux, 1993)	8
3	Nouveaux métabolites produits par des actinomycètes marins durant la période 2003-2005 (Lam, 2006)	10
4	Pigmentation des souches isolées sur différents milieux	Annexe III
5	Croissance des isolats sur le milieu ISP1 à pH=5 et à pH=10 (à 0% de NaCl)	37
6	Couleur du milieu ISP7 (0% de NaCl)	37
7	Résultats concernant l'étude de la production de nitrate réductase par les cinq souches	38
8	Résultats concernant la dégradation de la caséine du lait	40
9	Croissance à différentes températures des isolats d'actinomycètes	41
10	Tolérance des isolats au chlorure de sodium	42
11	Durée d'incubation minimale nécessaire pour l'observation d'un début de croissance des isolats à 28°C en fonction du milieu d'ensemencement	43
12	Tests d'utilisation des sucres comme seule source de carbone	44
13	Résultats de la dégradation de la tyrosine	45
14	Résultats de la dégradation de la xanthine	45
15	Résultats de la dégradation du tween80	45
16	Résultats des tests complémentaires	46

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : synthèse bibliographique.....	3
1- Généralités sur les antibiotiques.....	3
2- Les actinomycètes.....	7
2-1- Ecologie des actinomycètes.....	7
2-1-1- Les sols.....	7
2-1-2- Le milieu marin.....	
2-2- Critères d'identification des actinomycètes.....	11
2-3- La classe Actinobacteria.....	13
2-4- Le genre Streptomyces.....	14
2-4-1- Généralités.....	14
2-4-2- Morphologie et cycle de vie.....	15
2-5- Métabolites et importance des actinomycètes.....	17
2-6- Actinomycètes thermophiles et halophiles.....	21
2-6-1- Actinomycètes thermophiles.....	21
2-6-2- Actinomycètes halotolérants ou halophiles.....	22
Chapitre II : Partie pratique.....	24
1- Matériels et méthodes.....	24
1-1- Origine et prélèvement des échantillons.....	24
1-2- Isolement des souches.....	24
1-3- Sélection des colonies d'actinomycètes.....	24
1-4- Culture des actinomycètes isolés sur milieu liquide.....	25
1-5- Caractérisation des souches d'actinomycètes isolées.....	25
1-5-1- Etude morphologique.....	25
1-5-2- Etude des caractères physiologiques.....	25
1-6- Etude de l'activité antimicrobienne.....	27
1-7- Etude chimiotaxonomique.....	28
2- Résultats et discussion.....	30
2-1- Isolement.....	30
2-2- Caractérisation des isolats.....	32
2-2-1- Etude macromorphologique.....	32
2-2-2- Etude micromorphologique.....	36
2-2-3- Etude physiologique.....	36

2-2-3-1- L'influence du pH sur la croissance des isolats.....	36
2-2-3-2- Production de pigments mélanoides.....	37
2-2-3-3- Production de nitrate réductase.....	38
2-2-3-4- Dégradation de la caséine du lait.....	39
2-2-3-5- Température de croissance.....	41
2-2-3-6- Tolérance des isolats au chlorure de sodium.....	42
2-2-3-7- Sensibilité au cristal violet et/ou à un mélange de sels biliaires.....	43
2-2-3-8- Utilisation des sucres comme source de carbone.....	44
2-2-3-9- Dégradation de la tyrosine.....	45
2-2-3-10- Dégradation de la xanthine.....	45
2-2-3-11- Dégradation du tween80.....	45
2-2-3-12- Tests complémentaires.....	46
2-3- Etude de l'activité antimicrobienne.....	47
2-4- Chimiotaxonomie de l'actinomycète B.....	52
2-4-1- Etude de la présence de sucres caractéristiques.....	52
2-4-2- Mise en évidence de l'acide diaminopimélique et de la glycine.....	53
Conclusion.....	55
Références bibliographiques.....	57
Annexes	

Introduction

Introduction

Les agents antimicrobiens sont largement utilisés dans plusieurs domaines : thérapie humaine, vétérinaire, phytopathologie, industries alimentaires, et traitement du cuir et bois. Bon nombre de ces agents sont produits par des microorganismes (**Zitouni et al., 2004**). En effet, les métabolites secondaires produits par les microorganismes représentent une large source de composés d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique très important. En pratique, il est prouvé que la capacité de produire différents composés est limitée à des groupes de microorganismes eucaryotes et de bactéries en particulier les actinomycètes filamenteux (**Zerizer et al., 2006**).

Les actinomycètes, surtout les Streptomyces représentent un groupe important de bactéries, non seulement comme des bactéries qui dégradent la matière organique dans l'environnement naturel, mais parce qu'ils sont aussi des producteurs d'antibiotiques et d'autres composés utiles d'intérêt commercial (**Zhao et al., 2004**).

La prépondérance des antibiotiques parmi les produits d'intérêt industriel issus des actinomycètes est liée à la richesse du métabolisme secondaire de ce groupe microbien mais aussi à l'exploitation de ce potentiel par la mise en œuvre, notamment dans les grandes firmes pharmaceutiques, de multiples méthodes d'isolement d'actinomycètes et de sélection d'activités antibiotiques variées couplées à des moyens puissants de purification et d'étude de ces substances naturelles (**Theilleux, 1993**).

Ce groupe est unique dans le nombre d'antibiotiques faits de lui, et dans la diversité des structures chimiques et des modes d'action de ces antibiotiques (**Hopwood et Merrick, 1977**). Les streptomycètes produisent plus d'antibiotiques que tout autre genre de bactéries (**Cook et Meyers, 2003**).

Depuis leur introduction dans les années 40, les antibiotiques ont été le traitement primaire des infections bactériennes (**Hooton et Levy, 2001**). Cependant, la résistance aux antibiotiques a été un problème depuis l'introduction de la pénicilline G et des sulfonamides dans les années 40 (**Norrby, 1995**). En effet, peu de temps après l'entrée de chaque agent antibactérien en pratique clinique, la résistance a été signalée chez au moins un pathogène bactérien (**Bush, 2004**).

Cette résistance microbienne aux antibiotiques est à la hausse (**Khachatourians, 1998**), et le rythme, avec lequel de nouveaux antibiotiques sont entrain d'être produits, ralentit (**Russell, 2002**). D'où un déclin progressif du nombre des antibiotiques qui sont efficaces pour le traitement des infections humaines (**Macovei et Zurek, 2006**).

une alternative pour lutter contre le problème de la résistance microbienne est le développement de nouveaux antibactériens pour la substitution de ceux qui sont inefficaces (**Bonjar et al., 2004**).

L'étude de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinomycètes est cruciale pour la découverte de nouveaux actinomycètes et par la suite de produits naturels à la base de la découverte de médicaments (**Hozzein et al., 2008**). En effet, l'isolement de souches d'Actinomycétales actives à partir d'écosystèmes non ou peu exploités permet, éventuellement, la découverte de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité (**Boughachiche et al., 2005**).

Ainsi, l'exploration des écosystèmes où un ou plus des facteurs environnementaux sont extrêmes (température, pH, aération ou stress osmotique) favorise la détection d'Actinomycétales pouvant, éventuellement, avoir un potentiel d'activité antibactérien et/ou antifongique important (**Zerizer et al., 2006**).

L'objectif de ce travail est l'isolement d'actinomycètes halotolérants, la caractérisation morphologique, physiologique et chimiotaxonomique de ceux d'entre eux qui présenteraient les meilleures activités antimicrobiennes vis-à-vis de germes cibles (bactéries et champignons).

Synthèse bibliographique

Généralités sur les antibiotiques

1- Généralités sur les antibiotiques

Les agents chimiothérapeutiques sont des substances chimiques utilisées pour le traitement des maladies infectieuses ou celles causées par la prolifération de cellules malignes (**Pelczar et al., 1986**). L'utilisation d'agents chimiques en thérapeutique (la chimiothérapie) prit son véritable essor en 1909 lorsque Ehrlich formula le principe de base suivant : pour être utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses, une substance doit être nuisible pour le micro-organisme parasite mais inoffensive pour les cellules hôtes. Elle doit être douée de « toxicité sélective » (**Leclerc et al., 1995**).

Ces substances sont préparées par synthèse chimique ou obtenues à partir de microorganismes et de certains animaux et plantes. En général, les substances naturelles se distinguent des composés synthétiques par le nom d'antibiotiques (**Pelczar et al., 1986**).

Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances de structure souvent complexe (**Pieri et Kirkiacharian, 1992**), qui manifestent à faibles concentrations des activités biologiques de nature principalement antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses, antivirales ou antiparasitaires (**Theilleux, 1993**). Il existe deux catégories d'antibactériens :

- * Les antibactériens à effet bactériostatique qui inhibent la croissance bactérienne.
- * Les antibactériens bactéricides qui lysent les bactéries (**Terki, 2006**).

Depuis les découvertes de la pénicilline par Alexander Fleming, des sulfamides par Gerhard Domagk et de la streptomycine par Selman Waksman, qui valurent à chacun de ces trois chercheurs le prix Nobel, de très nombreuses substances ayant une activité antibactérienne ont été isolées (**Berche et al., 1989**). Mais parmi ces dernières un petit nombre seulement a été retenu pour l'usage clinique (**Duval et Soussy, 1990**).

Classification des antibiotiques

En général, c'est la classification chimique qui est le plus souvent en usage. Elle part du principe que les antibiotiques sont composés d'unités chimiquement définies (**Leclerc et al., 1995**). Les molécules qui présentent une structure chimique de base identique sont regroupées dans une même famille (**Berche et al., 1989**) (tableau 1).

Tableau 1. Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Zitouni, 2005).

Familles	Exemples d'antibiotiques
Antibiotiques contenant des glucides	nojirimycine, streptomycine, gentamicine, kanamycine, vancomycine, risotocétine
Lactones macrocycliques	érythromycine, spiramycine, nystatine, amphotéricine, maytansine
Quinones et antibiotiques apparentés	Tétracyclines, anthracyclines, rubomycine, mitomycine, saframycine
Acides aminés et peptides	pénicilline, cyclosérine, bacitracine, valinomycine, polymyxines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	Mildiomycine, phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	Monensine
Antibiotiques aromatiques	Chloramphénicol, griséofulvine, novobiocine
Antibiotiques alicycliques	Cycloheximide, acide marasmique, acide fusidique
Antibiotiques aliphatiques	Elaiomycine, céruléine, fosfomycine

Utilisation des antibiotiques

Les antibiotiques ont été utilisés dans de nombreux domaines y compris l'agriculture, le domaine vétérinaire et l'industrie pharmaceutique (Oskay et al., 2004),

Les antibiotiques additionnés à de faibles concentrations aux aliments des animaux le sont à deux titres :

- ▶ Zootechnique, en stimulant la croissance et en améliorant le rendement alimentaire ;
- ▶ Prophylactique, en protégeant les jeunes en début d'élevage ou dans des conditions de stress (Theilleux, 1993).

Une des raisons de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques pourrait résider dans l'utilisation préventive et thérapeutique d'antibiotiques en production animale (Schaeren, 2006).

Des antibiotiques destinés à l'agriculture ont été également développés. Leurs activités s'étendent à différents domaines : contrôle des maladies des végétaux, insecticides, herbicides et régulateurs du métabolisme végétal (Theilleux, 1993).

Une autre raison de l'augmentation de la résistance pourrait être l'utilisation des antibiotiques en agriculture (**Cole et al., 2003**).

Les antifongiques

Parmi les différents types de médicaments qui prévalent sur le marché, les antibiotiques antifongiques représentent un petit groupe de médicaments mais significatif et a un rôle important dans le contrôle des maladies mycosiques (**Augustine et al., 2005 (1)**). Vu que, les champignons microscopiques sont responsables d'un grand nombre d'affections chez l'homme, les animaux et les végétaux. Ils sont la cause de nombreux dégâts occasionnés aux bois, aux produits agricoles, aux denrées alimentaires et à divers supports (**Badji et al., 2005**). Cependant, la recherche de nouveaux antibiotiques antifongiques a progressé lentement. Une des raisons de cette lente progression par rapport aux antibactériens est que, comme les cellules de mammifères, les champignons sont des eucaryotes et donc les agents qui inhibent la biosynthèse de protéines, d'ARN ou ADN chez les champignons ont aussi un potentiel de toxicité plus important pour l'hôte (**Augustine et al., 2005 (1)**). En effet, les champignons ont une machinerie pour la synthèse de protéines et d'acides nucléiques similaire à celle des animaux supérieurs. Il est, donc, très difficile de découvrir des composés qui inhibent sélectivement le métabolisme fongique sans exposer aucune toxicité pour les humains (**Augustine et al., 2005 (2)**).

L'incidence des infections fongiques a augmenté de façon dramatique au cours de la dernière décennie et celles-ci se classent maintenant au quatrième rang des infections nosocomiales. *Candida* et *Aspergillus* constituent les deux principaux types de champignons pathogènes (**Carle, 2003**).

Alors, au vu de l'éventail restreint des molécules utilisées en fongithérapie et avec l'apparition des multirésistances, l'industrie pharmaceutique et les chercheurs se sont tournés vers la recherche de nouveaux antifongiques plus performants et moins agressifs pour l'organisme (**Badji et al., 2005**). Aujourd'hui la nécessité de nouveaux antifongiques, non agressifs pour l'organisme et plus efficaces est donc un défi important pour l'industrie pharmaceutique (**Augustine et al., 2005 (1)**).

En plus, la recherche de nouveaux principes dans le biocontrôle des pathogènes des plantes différents des fongicides classiques utilisés est une préoccupation mondiale (**Zarandi et al., 2009**). Vu que, les limites des fongicides synthétiques, pour le contrôle des maladies des plantes sont devenues apparentes au cours des dernières années et d'autres méthodes de contrôle sont nécessaires d'urgence (**Azab et al., 2006**).

Effectivement, l'inquiétude à propos des influences environnementales, tels que : un sol toxique et des contaminations de l'eau, des résidus de pesticides dans les plantes et les coûts élevés des produits chimiques, est en augmentation. Elle encourage donc les fermiers et les chercheurs à chercher des agents de biocontrôle (**Apichaisataienchote et al., 2006**).

Selon Goodfellow et Williams, les actinomycètes sont parmi les agents de biocontrôle les plus étudiés (**Soares et al., 2006**).

Synthèse bibliographique

Les actinomycètes

2- Les actinomycètes

2-1- Ecologie des actinomycètes

On retrouve des actinomycètes dans le fumier, foin, pollen des plantes, les pailles, grains de céréales, débris végétaux, sols glaciaires de l'arctique, déserts chauds et secs de divers continents, (**Sabaou, 1988**), dans de différentes masses d'eau (**Rifaat, 2003**), etc.

Ils sont un groupe de microorganismes largement distribués dans la nature (**Oskay et al., 2004**), Car ces organismes ont des exigences réduites et tirent leur énergie à partir d'une source très variée de substrats carbonés (**Leclerc et al., 1977**).

2-1-1- Les sols

Les actinomycètes présentent une proportion élevée de la biomasse microbienne du sol (**Tan et al., 2006**). En effet, Plus d'un million d'actinomycètes peuvent être trouvés dans un gramme de sol (**Srivibool et Sukchotiratana, 2006**). En particulier, les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents. Mais, Comme le montre le tableau 2, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95% des souches d'actinomycètes isolées (**Theilleux, 1993**).

La plupart des actinomycètes ont été impliqués dans la dégradation de substrats récalcitrants, telles que les lignocelluloses (**Zhang et al., 2009**). En effet, les actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique (**Seong et al., 2001**), tel que l'amidon (**Crawford et al., 1993**). Ils contribuent significativement au turnover de biopolymères complexes (**Abou-Elela et Ghanem, 2005**) ; à la productivité du sol ; à l'accumulation de substances biologiquement actives ; et à la régulation du budget d'azote dans les sols (**Zenova et al., 2007**), étant donné que dans les symbioses actinorhiziennes *Frankia* reçoit sa source de carbone de la plante hôte, tout en recevant à son tour du microsymbionte 70%-100% de son besoin en azote (**Roy et al., 2007**). En effet, des études montrent que l'utilisation des streptomycètes améliore la croissance des plantes cultivées (**Zarandi et al., 2009**).

La présence des actinomycètes est très influencée par les conditions environnementales d'humidité, température, pH et végétation (**Basilio et al., 2003**). En effet, le nombre et la proportion des actinomycètes dans la microflore tellurique dépendent de nombreux facteurs dont les principaux sont :

- _ La nature et l'abondance des matières organiques.
- _ La profondeur ; 2 à 15 cm est généralement la profondeur optimale.
- _ Le pH ; les actinomycètes préfèrent un pH compris entre 7 et 8 (**Theilleux, 1993**). En effet, les actinomycètes du sol, pour la plupart, montrent leur croissance optimale dans

des conditions neutres et légèrement alcalines, et les procédures d'isolement ont été traditionnellement basées sur ce caractère neutrophilique. Cependant, des travaux ont montré l'existence d'une grande diversité d'actinomycètes acidophiles (**Basilio et al., 2003**). Ces derniers sont communs dans des habitats terrestres tels que des forêts acides où ils sont un constituant majeur de la communauté des actinomycètes (**Kim et al., 2004 (2)**). Leur croissance optimale apparaît à un pH d'approximativement 4,5-5 dans des gammes de température mésophiles. Cependant, des études ont indiqué qu'il y a deux groupes principaux d'actinomycètes acidophiles selon les profils des pH de croissance, à savoir le groupe des acidophiles stricts et le groupe des acidophile neutrotolérants (**Cho et al., 2006**).

_ L'aération et L'humidité ; la plupart des actinomycètes sont aérobies et préfèrent des taux d'humidité peu élevés de l'ordre de 10 à 30% (**Theilleux, 1993**).

Tableau 2. Fréquence de divers genres d'actinomycètes dans le sol.

Genres	%
Streptomyces	95,34
Nocardia	1,98
Micromonospora	1,40
Thermomonospora	0,22
Actinoplanes	0,20
Microbispora	0,18
Mycobacterium	0,14

D'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents (selon Lechevalier et Lechevalier, 1967) (**Theilleux, 1993**).

2-1-2- Le milieu marin

L'océan couvre environ 70% de la surface de notre planète (**Jiang et al., 2007**), et on en sait peu sur la diversité microbienne des sédiments marins (**Magarvey et al., 2004**). En effet, bien que la diversité des actinomycètes du sol a été largement étudiée, relativement peu d'efforts ont été tentés avec les actinomycètes aquatiques (**Jiang et Xu, 1996**). Cependant, il y a une immense richesse microbienne cachée dans l'environnement marin et des tentatives sont en train d'être faites pour découvrir ce trésor inestimable (**Ramesh et al., 2006**).

Actinomycètes du milieu marin

La population des actinomycètes a été initialement considérée comme l'un des grands groupes de la population du sol, mais elle a été isolée de plus en plus à partir de divers échantillons marins (**Das et al., 2008**).

En effet, Colquhoun et *al.* ont isolé un grand nombre d'actinomycètes de type mycolata à partir de sédiments de mer profonde. Par ailleurs une souche d'actinomycète a été isolée dans les mêmes types de sédiments par Imada et Okami, et qui produit un inhibiteur de la beta-glucosidase (**Das et al., 2006**). En outre, Moran et *al.* (1995) ont montré que dans des sédiments de marais côtiers, les streptomycètes ont représenté 2-5% de la communauté microbienne (**Rintala, 2003**).

Le milieu marin est en train d'émerger comme une nouvelle source prometteuse d'Actinobacteria (**Montalvo et al., 2005**). Effectivement, de nouvelles bactéries de la classe Actinobacteria avec un potentiel biopharmaceutique ont été isolées de plus en plus d'habitats marins (**Kim et al., 2006**).

En effet, Kanoh et *al.* ont rapporté qu'au cours du criblage de substances antitumorales à partir de microorganismes dérivés de milieux marins ils ont trouvé un composé cyclique, mechercharmycin A (1), et son congénère linéaire, mechercharmycin B (2). La souche produisant 1 et 2, *Thermoactinomyces sp. YM3-251*, a été isolée à partir de boues marines collectées à Mecharchar dans la république des Palaos (**Kanoh et al., 2005**).

L'opinion selon laquelle des actinomycètes peupleraient normalement le milieu marin est très controversée. Selon les uns, les souches d'actinomycètes isolées de tels milieux ne seraient que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer ; selon d'autres, il existerait bien une flore d'actinomycètes propre aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible (**Theilleux, 1993**).

Les observations en accord avec l'hypothèse des spores issues de systèmes terrestres incluent le degré élevé de la tolérance au sel démontré par plusieurs isolats de streptomycètes terrestres ; la production de spores résistantes par des streptomycètes qui pourraient facilement être transportées vers des habitats marins et stockées pour des périodes prolongées (**Moran et al., 1995**), vu que des souches d'actinobactéries filamenteuses peuvent exister pour de longues périodes de temps comme des spores, par exemple cent ans dans les sédiments (**Lewis et al., 2009**) ; et l'abondance décroissante apparente des streptomycètes cultivables dans des milieux marins avec l'éloignement de la terre et l'augmentation de la profondeur d'eau (**Moran et al., 1995**).

Cependant, Mincer et *al.* ont rapporté récemment la découverte du premier genre d'actinomycète obligatoirement marin pour lequel le nom « Salinospora » a été proposé à l'origine et par la suite a été changé par Salinispora. Ce nouveau taxon appartient à la famille Micromonosporaceae et est la source de nouveaux métabolites secondaires y compris salinosporamide A, un agent anticancéreux puissant ciblant spécifiquement la sous unité 20s du protéasome des mammifères (Mincer et *al.*, 2005).

Au cours des dernières années les microorganismes marins sont devenus importants pour l'étude de nouveaux produits microbiens exposant des propriétés antimicrobiennes, antivirales, et antitumorales. Ces composés actifs pourraient servir comme des systèmes modèles pour la découverte de nouveaux médicaments (Kokare et *al.*, 2004).

Nouveaux métabolites isolés d'actinomycètes marins

Malgré que l'exploitation des actinomycètes marins comme une source pour la découverte de nouveaux métabolites secondaires soit au premier stade, de nombreux nouveaux métabolites ont été isolés au cours des dernières années. Le tableau 3 montre certains exemples de nouveaux métabolites secondaires isolés d'actinomycètes marins de 2003 à 2005 (Lam, 2006).

Tableau 3. Nouveaux métabolites produits par des actinomycètes marins durant la période 2003-2005 (Lam, 2006).

Composé	Source
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>
Bonactin	<i>Streptomyces sp.</i>
Caprolactones	<i>Streptomyces sp.</i>
Chinikomycins	<i>Streptomyces sp.</i>
Chloro-dihydroquinones	Nouvel actinomycète
3,6 indoles disubstitués	<i>Streptomyces sp.</i>
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces sp.</i>
Gutingimycin	<i>Streptomyces sp.</i>
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>
Himalomycins	<i>Streptomyces sp.</i>
IB-00208	<i>Actinomadura sp.</i>
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>

Tableau 3. Nouveaux métabolites produits par des actinomycètes marins durant la période 2003-2005 (suite) (**Lam, 2006**).

Composé	Source
MKN-349A	<i>Nocardiopsis sp.</i>
Salinosporamide A (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>
Sporolides	<i>Salinispora tropica</i>

2-2- Critères d'identification des actinomycètes

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques, et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires (exemple : hybridation ADN-ADN) séparant les espèces (**Nouredine, 2006**).

Caractéristiques macromorphologiques

Les caractères importants sont, la présence ou non d'un mycélium aérien (MA), la couleur du MA et du mycélium du substrat (MS) et des pigments solubles (PS), c'est-à-dire, diffusibles dans le milieu externe (**Nouasri, 1996**).

Caractéristiques micromorphologiques

La micromorphologie est déterminée par observation directe au microscope optique (objectifs 10 et 40) des cultures poussant sur les milieux gélosés. Certains détails nécessitent l'observation entre lame et lamelle en utilisant l'objectif 100 du microscope optique ou parfois l'utilisation du microscope électronique. Les observations portent sur le MA et le MS (**Zitouni, 2005**).

Critères chimiques

Composition en acides aminés et en sucres

Il s'agit de déterminer les constituants pariétaux, particulièrement l'isomère (LL ou DL=méso) de l'acide diaminopimélique (DAP) et la présence ou non de la glycine. Dans les cellules entières, les sucres ayant une importance taxonomique sont les couples « arabinose-galactose », « arabinose-xylose » ou encore le madurose ou 3-o- méthyl galactose (**Nouasri, 1996**). Parfois le DAP est remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique (**Nouredine, 2006**).

Lipides membranaires et pariétaux

Dans le cas de certains genres, la composition en acides aminés et en oses n'est pas suffisante pour l'identification. Il est nécessaire alors d'analyser les lipides cellulaires, principalement, les acides mycoliques, les phospholipides et les ménaquinones (**Nouasri, 1996**).

Critères physiologiques

L'étude physiologique permet de distinguer les espèces d'actinomycètes appartenant à un même genre. Plusieurs types de tests sont ainsi utilisés. Ils portent sur la dégradation ou non de plusieurs composés glucidiques, lipidiques, protidiques ou autres et la sensibilité ou la résistance à quelques agents physiques et chimiques (pH, température, concentration ionique, antibiotiques, etc.) (**Nouredine, 2006**).

Critères moléculaires

La biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant en taxonomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer la création d'une nouvelle espèce sans passer par les analyses génétiques. Ces études génétiques ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes, de regrouper ou de séparer des espèces entre elles ou de fusionner des genres entre eux (**Zitouni, 2005**).

Hybridation ADN-ADN

L'introduction des expériences de réassociation ADN-ADN mesurent les similitudes flagrantes entre des ADN simples brins de souches d'espèces étroitement liées (**Stackebrandt et al., 1997**).

Séquençage de l'ADN ribosomique

La détermination des similitudes des séquences des ADNr et des ARNr 16s révèle l'étendue de la variation de séquences entre des souches à tous les niveaux de parenté (**Stackebrandt et al., 1997**).

Détermination du coefficient de Chargaff (G+C%)

Ce coefficient est considéré comme important dans l'identification des genres et des familles d'actinomycètes et doit être obligatoirement déterminé lors de la création d'un nouveau genre. Il a permis de revoir la définition des actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55% et de les différencier des autres bactéries à Gram+ dont le G+C est inférieur à 55%, tels que les Bacillaceae et les Lactobacillaceae.

Ainsi certaines bactéries non mycéliennes comme *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium* et *Arthrobacter* sont considérées comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinomycètes (**Nouredine, 2006**).

2-3- La classe Actinobacteria

La figure 1 montre différents sous-classes, ordres, sous-ordres, et familles de la classe Actinobacteria.

Classe Actinobacteria				
Sous-classe Acidimicrobidae	Ordre Acidimicrobiales	Famille Acidimicrobiaceae		
Sous-classe Rubrobacteridae	Ordre Rubrobactérales	Famille Rubrobacteraceae		
Sous-classe Coriobacteridae	Ordre Coriobactérales	Famille Coriobacteriaceae		
Sous-classe Sphaerobacteridae	Ordre Sphaerobactérales	Famille Sphaerobacteraceae		
Sous-classe Actinobacteridae	Ordre Actinomycétales			
Sous-ordre Actinomycineae	Sous-ordre Micrococcineae	Sous-ordre Corynebacterineae	Sous-ordre Micromonosporineae	Sous-ordre Propionibacterineae
Famille Actinomycetaceae	Familles Micrococcaceae Brevibacteriaceae Cellulomonadaceae Dermabacteraceae Dermatophilaceae Intrasporangiaceae Jonesiaceae Microbacteriaceae Promicromonosporaceae	Familles Corynebacteriaceae Dietziaceae Gordoniaceae Mycobacteriaceae Nocardiaceae Tsukamurellaceae	Famille Micromonosporaceae	Familles Propionibacteriaceae Nocardiodaceae
Sous-ordre Pseudonocardineae	Sous-ordre Streptomycineae	Sous-ordre Streptosporangineae	Sous-ordre Frankineae	Sous-ordre Glycomycineae
Famille Pseudonocardiaceae	Famille Streptomycetaceae	Familles Streptosporangiaceae Nocardiopsaceae Thermomonosporaceae	Familles Frankiaceae Acidothermaceae Geodermatophilaceae Microsphaeraceae Sporichthyaceae	Famille Glycomycetaceae
	Genres Streptomyces Kitasatospora Streptoverticillium (anonyme 1)			
				Ordre Bifidobacteriales Famille Bifidobacteriaceae

Figure 1. Système de classification hiérarchique proposé de la classe Actinobacteria basé sur les analyses phylogénétiques des données de la séquence ADNr/ARNr 16s (**Stackebrandt et al., 1997**).

2-4- Le genre *Streptomyces*

2-4-1- Généralités

Le genre *Streptomyces* appartient au groupe des streptomycètes (**Colombié, 2005**), qui sont des bactéries Gram positives à G+C élevé (**Gust et al., 2003 ; Mahr et al., 2000**), largement distribués dans une variété d'environnements naturels et synthétiques, constituant un composant significatif de la population microbienne dans la plupart des sols (**Ilić et al., 2005**). En effet, au moins 90% des actinomycètes isolés du sol sont des *Streptomyces spp.* (**Narayana et al., 2007**).

Selon **Anderson et Wellington (2001)**, d'après certains changements, le genre *Streptomyces* est le seul membre de la famille Streptomycetaceae de la classe Actinobacteria de l'ordre Actinomycétales. Ce dernier, selon **Hopwood (2006)**, contient environ 120 genres.

En effet, des Comparaisons de séquences d'ARNr 5S de streptomycètes acidophiles et neutrophiles ont confirmé le statut taxonomique de *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa*, *Microellobosporia* en tant que membres du genre *Streptomyces* (**Anderson et Wellington, 2001**).

Witt & Stackebrandt (1990) ont proposé l'unification des genres *Streptomyces* et *Streptoverticillium* sur la base de la séquence partielle et des analyses d'hybridation de l'ARNr des espèces décrites précédemment comme *Streptoverticillium* par Locci & Schofield (1989) (**Palmano et al., 2000**).

En effet, le séquençage partiel de l'ARNr 16s de 14 espèces appartenant aux genres *Streptomyces* et *Streptoverticillium* ainsi que les données de l'analyse phénotypique numérique et des propriétés chimiotaxonomiques donnent une possibilité pour inclure le genre *Streptoverticillium* dans le genre *Streptomyces* (**Christova et al., 1995**).

En outre, *Kitasatosporia* a également été inclus dans le genre *Streptomyces*, malgré les différences dans la composition des parois cellulaires, sur la base des similitudes de l'ARNr 16S (**Anderson et Wellington, 2001**).

Le genre *Streptomyces* contient de la glycine et de l'acide diaminopimélique (**Kawamoto et al., 1981**), mais uniquement l'isomère L de l'acide diaminopimélique (**Tisdall et Anhalt, 1979**). Il est également caractérisé par l'absence de sucres caractéristiques dans la paroi cellulaire. Il a été classé en espèces différentes sur la base de la morphologie et des caractéristiques chimiotaxonomiques de la paroi cellulaire des organismes (**Lee et al., 2005**).

Ce genre contient le plus grand nombre d'espèces parmi les genres de l'ordre Actinomycétales (**Kim et al., 2004 (1) ; Ochi, 1995**). En plus, il contient actuellement le plus grand nombre d'espèces de n'importe quel genre dans le domaine Bacteria (**Hain et al., 1997**). Il a été rapporté récemment que le genre *Streptomyces* comprend environ 527 espèces (**Sripairoj et al., 2008**). Cependant, l'industrie pharmaceutique, au cours de plusieurs décennies, a probablement isolé et criblé des millions de souches de *Streptomyces* (**Busti et al., 2006**).

Notons que, *Streptomyces coelicolor* est l'organisme modèle le plus largement étudié du genre *Streptomyces* (**Mehra et al., 2008**). En effet, la séquence du génome complet de *Streptomyces coelicolor* est disponible (**Lian et al., 2008**).

2-4-2- Morphologie et cycle de vie

Pour certains auteurs, les actinomycètes sont des bactéries avec une morphologie fongique (**El-nakeeb et Lechevalier, 1963 ; Becker et al., 1965**). En particulier, le genre bactérien *Streptomyces* effectue une différenciation morphologique complexe ressemblant à celle des champignons filamenteux (**Endo et al., 2002**). Les espèces de *Streptomyces* produisent effectivement des mycéliums du substrat et aérien considérablement ramifiés (**Lee et al., 2005**).

En fait, les colonies des streptomycètes sont maintenant considérées comme des organismes multicellulaires contenant des populations d'hyphes morphologiquement et biochimiquement différenciés (**Miguélez et al., 1999**).

A la différence de la plupart des bactéries, les espèces de *Streptomyces* exposent un cycle de vie multicellulaire (**Lei et al., 2004**), avec différenciation de l'organisme en tissus distincts (**Bentley et al., 2002**).

Quand une spore de *Streptomyces* rencontre des conditions favorables et des nutriments, elle germe (**Flårdh et Buttner, 2009**), et produit un ou plusieurs longs filaments multinucléoides (**Miguélez et al., 2000**). En effet, dans les premières étapes du cycle de vie, l'organisme se développe sur des milieux solides comme un hyphe du substrat multinucléoïde ramifié (**Yamanaka et al., 2005**).

Le mycélium végétatif (mycélium du substrat) se développe attaché à son substrat, formant un réseau d'hyphes qui pénètre le milieu solubilisant des molécules organiques par l'action d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (**Miguélez et al., 2000**).

La vitesse de la croissance des *Streptomyces* est beaucoup plus faible que celle d'*E. coli*, mais font une utilisation plus efficace de nutriments (**Dharmalingam et Cullum, 1996**). En effet, une telle morphologie filamenteuse permet une utilisation complète des

matières solides dans le sol, et permet aux streptomycètes de coloniser des substrats solides plus efficacement que les microorganismes unicellulaires, non motiles (**Miguélez et al., 2000**).

Puis l'hyphe du substrat produit un mycélium aérien (**Yamanaka et al., 2005**). En effet, quand la colonie vieillit, et les nutriments s'épuisent, des ramifications spécialisées émergent de la surface de la colonie à l'origine du mycélium aérien reproducteur qui se développe dans l'air verticalement vers le haut.

Bien que le mycélium du substrat a principalement une fonction végétative, le rôle du mycélium aérien semble être surtout reproducteur (**Miguélez et al., 2000**).

Cependant, *Streptomyces griseus*, est capable de former des spores même en culture liquide (dites spores submergées) sans la formation de mycéliums aériens si les cellules sont exposées à des conditions nutritionnelles appropriées (**Ochi, 1987**). En effet, une des caractéristiques importantes de *S griseus* qui la rendent différente des autres espèces de *Streptomyces* est la formation de spores en milieu liquide, pour cette raison la différenciation morphologique de cette espèce est plus facile à étudier (**Deák, 2004**).

La croissance rapide des hyphes aériens est accompagnée par une réplication intensive des chromosomes (**Kois et al., 2009**). Le mycélium aérien culmine en une longue chaîne de spores en formant des septa (**Yamanaka et al., 2005**). En effet, à la fin du cycle de croissance de la colonie, les hyphes aériens subissent de multiples septations qui sont à l'origine de chaînes de compartiments uninucléoides qui, finalement, se métamorphosent en spores (**Miguélez et al., 2000**).

Chez des *Streptomyces spp.* et certains actinomycètes formant un sporange, les septa semblent être formés en deux étapes. D'abord, le sporophore est séparé par un seul septum de l'hyphe correspondant. Ensuite l'hyphe sporogène est lui-même divisé par un certain nombre de septa en cellules qui sont finalement transformées en spores (figure 2) (**Kalakoutskii et Agre, 1976**). Les spores des *Streptomyces* sont des formes de propagation et de survie dans des conditions de vie défavorables (**Sholeva et Ivanova, 1995**).

Du fait de la précédente croissance du mycélium du substrat, les hyphes aériens se développent sur un milieu réduit en nutriments, ce qui soulève des questions sur la façon dont ces hyphes obtiennent les nutriments pour la croissance et la sporulation. Il a été rapporté que le mycélium aérien se développe principalement par la cannibalisation du mycélium végétatif, la dégénérescence de ce dernier fournit les réserves de nutriments nécessaires pour les hyphes aériens pour se développer loin de la surface de la colonie (**Miguélez et al., 2000**).

Effectivement, les actinomycètes ont un cycle de vie complexe qui comprend une différenciation morphologique (sporulation) et une différenciation physiologique (production d'antibiotiques) (Madduri et Hutchinson, 1995).

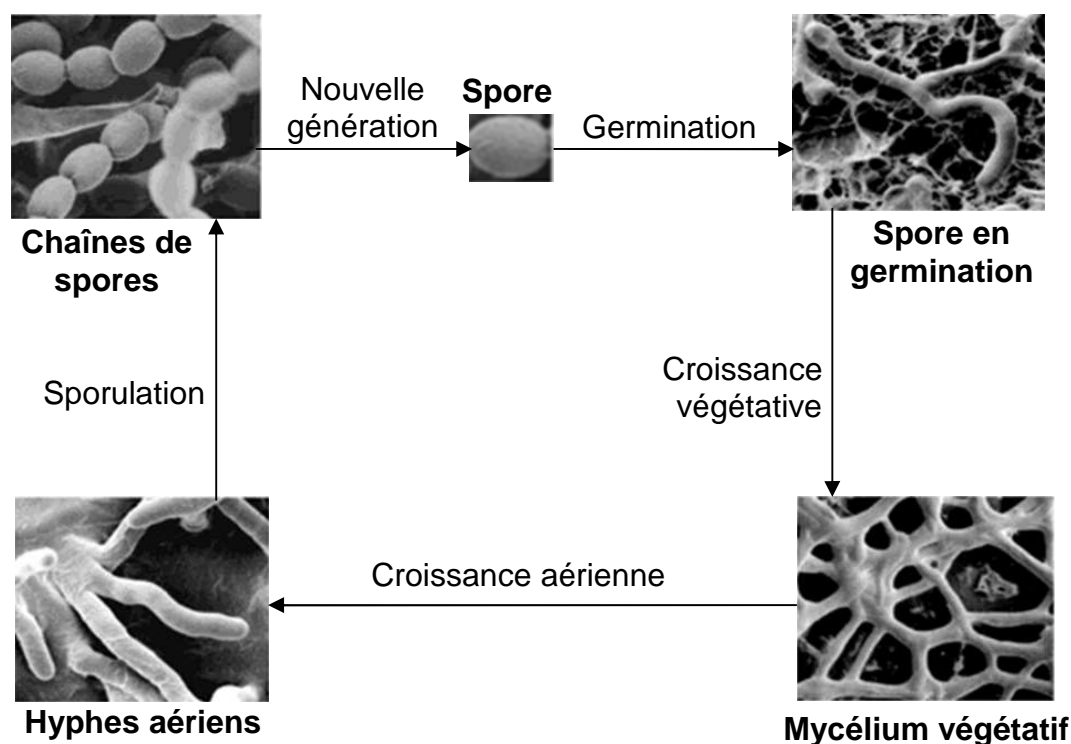


Figure 2. Le cycle de vie de *Streptomyces coelicolor* (Kieser et al., 2000).

2-5- Métabolites et importance des actinomycètes

L'intérêt des *Streptomyces* résulte de la conclusion que ce groupe de bactéries semble avoir la capacité de produire une grande variété de composés bioactifs différents qui ont un large spectre d'activité (Metsä-Ketelä et al., 2002). En effet, les streptomycètes sont remarquables pour leur capacité de produire une grande variété de métabolites secondaires (San Paolo, 2007), y compris de nombreuses substances essentielles pour la santé tels que des enzymes, immunomodulateurs et antibiotiques (Moncheva et al., 2002).

Production d'antibiotiques

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des producteurs majeurs d'antibiotiques et d'autres composés pharmacologiquement actifs (Rodríguez-García et al., 2005). Plusieurs de ces antibiotiques ciblent des sites spécifiques sur le complexe traductionnel, causant l'inhibition de la synthèse protéique à différents stades (Biuković, 2004).

Différentes espèces de Streptomyces produisent environ 75% des antibiotiques commercialement et médicalement utiles (**Ceylan et al., 2008**).

Approximativement 60% des antibiotiques qui ont été développés pour un usage agricole ont été isolés à partir d'espèces de Streptomyces (**Yilmaz et al., 2008**). En effet, des membres du genre Streptomyces sont des producteurs bien connus de plusieurs métabolites secondaires actifs contre des bactéries pathogènes des plantes (**Sahin, 2005**). L'arsenal d'antibiotiques les aide à rivaliser avec d'autres organismes dans le sol (**Mehra et al., 2008**).

Cependant, le rythme de la découverte de nouveaux composés a diminué, depuis que ces espèces ubiquitaires ont été largement étudiées (**Suzuki et al., 1999**).

Production d'enzymes

La capacité de produire une vaste série d'enzymes extracellulaires bien adaptées pour dégrader des matières organiques complexes favorisant la survie dans leur environnement naturel (**Tremblay et al., 2002**), peut être un phénomène intéressant chez ces procaryotes (**Mehta et al., 2006**).

Les streptomycètes sont capables de la biosynthèse et/ou de la biotransformation de nombreux types de composés organiques. Des biotransformations bien connues comprennent des hydroxylations, glycosylations, deglycosylations, méthylations et des réactions d'halogénéation (**Anyanwutaku et al., 1992**). En effet, les streptomycètes catalysent de nombreuses transformations de xénobiotiques d'une importance industrielle et environnementale (**Lamb et al., 2002**).

La capacité de produire une variété d'enzymes protéolytiques est un phénomène bien connu chez des actinomycètes de sources terrestres (**Vonothini et al., 2008**). On peut retenir la pronase de *S. griseus* et la Fradiase de *S. fradiae* (**Theilleux, 1993**).

Les actinomycètes, en particulier le genre Streptomyces, sont bien connus comme producteurs de nombreuses enzymes extracellulaires avec des propriétés de dégradation de polymères, y compris les chitinases (**Gomes et al., 2000**). En effet, ils ont la capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires qui leur donnent un rôle important dans la décomposition de la matière organique dans le sol (**Valois et al., 1996**).

Notons que, la production d'amylases microbiennes par des streptomycètes est affectée à une grande mesure par la composition du milieu (surtout par les sources de carbone et d'azote), la température d'incubation, les valeurs du pH et l'aération, la taille et l'âge de l'inoculum, et aussi par les périodes d'incubation (**Shatta et al., 1990**).

Plusieurs souches d'actinomycètes se sont révélées capables de dégrader des composants polymériques de la biomasse lignocellulosique (**Yamac et Tamer, 2008**). En plus, des membres des genres *Cellulomonas* et *Thermomonospora* sont des actinomycètes cellulolytiques bien connus (**Li, 1997**).

Des xylanases ont été isolées d'une large gamme de microorganismes y compris des actinomycètes (**Rifaat et al., 2005**). Notons qu'une xylanase (1,4-β-D-xylanohydrolase, EC 3.2.1.8) catalyse l'hydrolyse des liaisons xylosidiques du xylane en xylo-oligosaccharides et xylose, qui peuvent être utilisés comme aliment et combustible (**Keskar et al., 1992**).

Streptomyces sp. GNDU 1 est un autre organisme prometteur pour la production d'inulinase et la production industrielle de fructose à partir d'inuline (**Gill et al., 2003**).

Production d'acides aminés

Si l'on considère tout le groupe des corynéformes parmi lesquels les genres *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* et *Kurthia*, on peut affirmer que la majorité des acides aminés est produite par ces micro-organismes (**Theilleux, 1993**). En effet, *Corynebacterium glutamicum*, est utilisé en biotechnologie pour la production d'acides aminés tels que le glutamate, l'aspartate et la lysine (**Pimentel-Schmitt, 2006**).

Production de nucléotides

Les actinomycètes sont présents dans ce domaine puisque *S. aureus* est utilisé industriellement pour produire des enzymes nucléolytiques permettant d'hydrolyser l'ARN en 5'-nucléotides (**Theilleux, 1993**).

Production de vitamines

La vitamine B₁₂ a été isolée à partir de bouillons de fermentation de nombreux microorganismes, y compris des actinomycètes produisant des antibiotiques. En effet, *Wagman et al.* ont rapporté que toutes les souches de *Micromonospora* qu'ils ont testées ont produit l'activité de la vitamine B₁₂ (**Wagman et al., 1969**).

Cependant, les actinomycètes sont pratiquement absents dans ce domaine. *S. olivaceus* (qui produit la vitamine B₁₂) a été remplacé depuis longtemps par *Pseudomonas denitrificans* et deux souches de *Propionibacterium* bien plus productrices (**Theilleux, 1993**).

Importance des actinomycètes dans le compostage

Il existe de nombreuses définitions du compostage dans la littérature mais une définition très générale pourrait être : le compostage est un procédé biologique aérobie de dégradation et de transformation de la matière organique, permettant d'obtenir un produit valorisable à partir d'un déchet (**Albrecht, 2007**).

Une caractéristique du compostage est que les changements dans l'environnement physico-chimique produisent une succession rapide de différents groupes microbiens (**Adams et Frostick, 2009**). Parmi les bactéries, un sous-groupe a une grande importance au sein du compost : les actinomycètes.

Les actinomycètes sont des bactéries agissant plus tardivement que les autres (**Albrecht, 2007**). En effet, comme les actinomycètes se développent plus lentement que la plupart des bactéries ou des champignons, ils sont des compétiteurs inefficaces quand les niveaux des nutriments sont élevés, mais deviennent plus compétitifs à mesure que les niveaux des nutriments diminuent (**Boulter et al., 2000**).

Les actinomycètes peuvent dégrader la cellulose et la lignine comme certains champignons tout en tolérant des températures et un pH plus élevés que les champignons, bien que leur capacité de dégrader la cellulose et la lignine ne soit pas aussi étendue que celle des champignons (**Albrecht, 2007**).

Parmi les actinomycètes intervenant dans le compostage on peut citer : *Nocardia brasiliensis*, *Pseudonocardia thermophila*, *Saccharomonospora viridis*, *Saccharopolyspora rectivirgula*,... (**Lacey, 1997**). Cependant, les genres *Streptomyces* et *Nocardia* représentent plus de 90 % de leur biomasse selon Mustin (1987) (**Albrecht, 2007**).

Importance des actinomycètes dans la bioremédiation

La dégradation de polluants toxiques par des micro-organismes est apparue comme une stratégie d'assainissement prometteuse des eaux souterraines. Mahendra et Alvarez-Cohen, ont décrit une nouvelle espèce de *Pseudonocardia* qui peut croître sur le 1,4-dioxane, un polluant toxique des eaux souterraines (**Mahendra et Alvarez-Cohen, 2005**).

En plus, De nombreux actinomycètes peuvent dégrader différents polluants, y compris plusieurs pesticides. Par exemple, des membres du genre *Arthrobacter* dégradent le 4-chlorophénol (**Pizzul, 2006**).

En effet, la diversité métabolique des actinomycètes et leurs caractéristiques de croissance particulières les rendent des organismes intéressants pour la

bioremédiation (**Castillo et al., 2006**). En particulier les streptomycètes qui peuvent consommer presque tout, y compris des sucres, alcools, acides aminés, acides organiques, et composés aromatiques en produisant des enzymes hydrolytiques extracellulaires (**He, 2005**).

2-6- Actinomycètes thermophiles et halophiles

Les conditions extrêmes pour un organisme peuvent être essentielles pour la survie d'un autre, alors l'extrémophilie est un concept relatif (**Irwin et Baird, 2004**). Ainsi, les microorganismes nécessitant des environnements extrêmes pour la croissance sont appelés extrémophiles (**Gomes et Steiner, 2004**).

Les microbes des environnements extrêmes ont attiré une attention particulière au cours de ces dernières années (**Vasavada et al., 2006**). En effet, les extrémophiles sont une nouvelle ressource importante comme producteurs potentiels de nouveaux composés bioactifs (**Zhi et al., 2006**). En plus, les microbes des environnements extrêmes détiennent le secret de l'évolution moléculaire de la vie et de la stabilité des macromolécules (**Vasavada et al., 2006**).

L'extrémophilie désigne donc l'aptitude de certains organismes à se développer dans des conditions physiques et chimiques défavorables pour la plupart des organismes vivants. Parmi les domaines les plus étudiés de l'extrémophilie se trouvent les hautes températures (thermophilie), mais aussi les fortes salinités (halophilie) (**Lefebvre, 2005**).

2-6-1- Actinomycètes thermophiles

Les actinomycètes thermophiles prolifèrent dans des matières organiques en décomposition tels que le foin ou le compost de champignons où les conditions pour leur croissance sont favorables à cause de la chaleur générée dans les matières en décomposition (**Fink et al., 1971**).

Actuellement, plus d'attention est accordée aux streptomycètes thermophiles, en raison de leur importance potentielle en technologie microbienne (**Petrosyan et al., 2003**). A l'instar de *Thermobifida fusca* qui est d'un intérêt biotechnologique considérable comme une source de nouvelles enzymes thermostables (**Rahman et al., 2009**).

En effet, les enzymes thermostables offrent des vitesses de réaction plus élevées, une demi-vie et une stabilité opérationnelle plus grandes, une résistance plus grande envers des solvants organiques, et des risques de contamination plus faibles au cours de la fermentation (**Patke et Dey, 1998**).

Les streptomycètes thermophiles croient entre 25 et 55°C (**Kim et al., 1999**). Ces micro-organismes croient bien à 50°C (**Petrosyan et al., 2003**).

Patke et Dey, ont caractérisé de multiples protéases chez *S. megasporus SDP4* (Streptomyces thermophile) qui sont thermostables et alcalines (**Patke et Dey, 1998**).

Un autre exemple d'actinomycètes thermophiles est celui des espèces de *Thermomonospora*. Les espèces de *Thermomonospora* sont essentiellement des actinomycètes dégradant des carbohydrates, qui peuvent utiliser une large gamme de sucres végétaux et de carbohydrates polymériques (mais pas des protéines ou des acides aminés) comme des sources de carbone et d'énergie (**Stutzenberger, 1987**). En effet, *Thermomonospora fusca* est impliqué surtout dans dégradation de la lignocellulose avec un équipement enzymatique spécifique rapporté chez cet organisme (**Tuncer, 2000**).

Une souche de *Thermomyces lanuginosus (SSBP)* quant à elle a produit une xylanase qui conserve 100% de son activité à 60°C durant plus de 14 jours, avec une température et un pH optimums de 70°C et 6.0-6.5 respectivement (**Nel, 2001**).

2-6-2- Actinomycètes halotolérants ou halophiles

On différencie les bactéries halophiles des bactéries halotolérantes (**Lefebvre, 2005**). Les halophiles sont caractérisés par leur besoin d'une concentration élevée de sels inorganiques, surtout le chlorure de sodium, pour croître et survivre (**Valderrama et al., 1998**).

En effet, les bactéries nécessitant moins de 1% de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles (**Lefebvre, 2005**). En revanche, les bactéries capables de croître en présence de concentrations relativement élevées en sel sont considérées comme halotolérantes (**Mohamed et Galal, 2005**).

Trois catégories de bactéries halophiles peuvent être définies selon la concentration en sels qui amène à une croissance optimale des microorganismes (**Lefebvre, 2005**). Les organismes légèrement halophiles dans des environnements marins peuvent croître en présence de 2 à 3% de NaCl. Les halophiles modérés croient sur une gamme de concentration en NaCl beaucoup plus large (5 à 20% ; w/v). Les halophiles extrêmes sont capables de croître à saturation en NaCl et incapables de croître en présence de concentrations en NaCl inférieures à 12% (**Abbas, 2006**).

Chun et al. ont rapporté les résultats d'identification polyphasique d'une souche d'actinomycète, désignée HA-9t. Cette souche croît de manière optimale dans un milieu contenant 10% de NaCl et a montré des propriétés en accord avec sa classification dans

le genre *Nocardiopsis* comme une nouvelle espèce, à laquelle le nom *Nocardiopsis kunsanensis sp.nov.* est proposé (**Chun et al., 2000**).

Les genres *Actinopolyspora* et *Streptomonospora* sont deux groupes d'actinomycètes filamenteux strictement halophiles (**Zhi et al., 2006**). **Kokare et al.** ont rapporté qu'une espèce halophile *Actinopolyspora AH1* a été isolée d'un échantillon de sédiment marin. Cette souche a montré une bonne croissance dans un milieu contenant 10 à 15% (w/v) de NaCl et avec une température de 30 à 36°C. Elle a montré une bonne activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* et des activités antifongiques contre *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, des espèces de *Penicillium* et des espèces de *Trichoderma* (**Kokare et al., 2004**).

Partie pratique

Matériels et Méthodes

1- Matériels et méthodes**1-1- Origine et prélèvement des échantillons**Prélèvement et échantillons

Les prélèvements ont été réalisés à partir de sols avoisinant une source d'eau saline, au lieu dit Aith aloune dans le village Ighil Ouanter.

Lors de chaque prélèvement, une quantité de terre est récupérée de 0 à 10 cm de profondeur. Un tri écartant les pierres grossières a été réalisé. L'échantillon final (environ 50 g) est transféré dans un flacon de 250 ml.

Cinq échantillons composés (six prélèvements pour chaque échantillon) ont été ainsi constitués. Le transport vers le laboratoire a été effectué à température ambiante pour un trajet d'une durée d'environ deux heures.

1-2- Isolement des souches (méthode d'Al-zarban et al. (2002) modifiée).Préparation des suspensions de sol

10 g d'échantillon de sol ont été transférés dans des flacons contenant 100 ml d'eau physiologique stérile, puis agités doucement pendant 20 min, des séries de dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-3} ont été préparées.

Le milieu d'isolement

Le milieu nitrate amidon préconisé par **Al-zarban et al. (2002)**, a permis, selon ces auteurs, d'isoler deux actinomycètes présentant des activités kératolytiques, l'un est halophile (*Saccharomonospora halophila*) et l'autre halotolerant (*Nocardioopsis halotolerans*).

Le milieu nitrate amidon est ensemencés à raison de 0,1 ml d'une suspension de sol par boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées à 28°C pour 30 jours.

1-3- Sélection des colonies d'actinomycètes

Toutes les colonies assimilables, par leur aspect macroscopique, à des actinomycètes sont observées au microscope (Grossissement x 1000) à l'état frais et après coloration de Gram. Celles retenues seront repiquées, par la méthode des stries (**Boughachiche et al., 2005**).

1-4- Culture des actinomycètes isolés sur milieu liquide

Chaque actinomycète a été cultivé sur une fraction de 50 ml de bouillon nitrate amidon contenu dans un flacon de 250 ml pour environ 21 jours sous agitation à température ambiante. Les cellules ont été éliminées par centrifugation. Le surnageant de culture après centrifugation a été utilisé pour étudier l'effet antagoniste (**méthode d'Elsersy et Abou-elela, 2006 modifiée**).

Avant d'être conservé au congélateur pour les analyses ultérieures, le mycélium est lavé plusieurs fois à l'eau distillée et séché à 37 °C durant une nuit (**Nouredine, 2006**).

1-5- Caractérisation des souches d'actinomycètes isolées**1-5-1- Etude morphologique**Macromorphologie

Cette étude consiste à déterminer la couleur du mycélium aérien et du substrat ainsi que celle des pigments solubles éventuellement produits.

Micromorphologie

La micromorphologie est déterminée par observation directe au microscope optique (objectifs 10 et 40) des cultures poussant sur les milieux gélosés. Certains détails nécessitent l'observation entre lame et lamelle en utilisant l'objectif 100 (à immersion) du microscope optique (**Zitouni, 2005**).

1-5-2- Etude des caractères physiologiquesProduction de pigments mélanoïdes

L'observation des pigments mélanoïdes peut être réalisée sur un milieu gélosé ISP7 (**Nouredine, 2006**).

Utilisation des sucres comme seule source de carbone

L'utilisation des glucides peut être déterminée en notant la croissance sur un milieu ISP9 (**Sabaou, 1988**). Les sources de carbone testées étaient : le glucose, le saccharose, le lactose, le maltose, le fructose, le galactose et la cellulose.

Hydrolyse de la gélatine

Ce test est réalisé sur un milieu composé de 4 g de gélatine pour 100 ml de gélose nutritive (**Nouredine, 2006**). Après ensemencement les boîtes sont incubées à 28°C. Pour la mise en évidence de l'hydrolyse de la gélatine, les boîtes sont recouvertes par une

solution à 15% de chlorure mercurique. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (**Kecha, 1996**).

Hydrolyse de la caséine du lait

10 g de lait en poudre écrémé sont dissout dans 100 ml d'eau distillée (pH=7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH=7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boites de pétri stériles. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine (**Nouredine, 2006**).

Hydrolyse de la tyrosine et de la xanthine

0,4 g de chaque composé est mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée et la solution est stérilisée. Celle-ci est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile. La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies (**Nouredine, 2006**).

Hydrolyse du tween80

Le tween80, a été ajouté à un milieu contenant une solution saline, du $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, du NaNO_3 et de l'extrait de levure. La dégradation du tween80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies (**Nouredine, 2006**).

Hydrolyse de l'urée

Un milieu de Christensen est ensemencé par stries. Après incubation, l'apparition d'une teinte rouge traduit la décomposition de l'urée (**Kecha, 1996**).

Dégradation de sels de sodium

La dégradation d'un sel de sodium (l'oxalate de sodium), comme unique source de carbone dans un milieu gélosé minéral, est mise en évidence par le virage au rose-rouge d'un indicateur coloré (**Kecha, 1996**).

Production de nitrate réductase

Ce test est réalisé sur bouillon nutritif contenant 0,1% de Nitrate de potassium. Après ensemencement les tubes sont incubés à 28°C. Après que les réactifs I et II aient été ajoutés, la réduction des nitrates est mise en évidence par l'apparition d'une couleur

rouge. En l'absence de coloration, on ajoute du zinc en poudre. Si une coloration rouge apparaît le test est négatif, si elle n'apparaît pas le test est positif (**Kecha, 1996**).

Production de catalase

De l'eau oxygénée est déposée sur une colonie. Si la souche étudiée possède une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses (effervescence).

Tolérance au chlorure de sodium

Ce test est réalisé pour évaluer la tolérance des souches à différentes concentrations en NaCl sur le milieu ISP1 à 28°C pour environ 21 jours. Les différentes concentrations en NaCl utilisées sont : 0, 5, 10, 15, 20 et 30%.

Croissance à pH=10 (alcalin) et à pH=5 (acide)

Ce test est réalisé pour observer l'influence du pH sur la croissance des souches.

1-6- Etude de l'activité antimicrobienne

La sélection des souches productrices d'antibiotiques, notamment des antifongiques, est faite en réalisant des tests d'antagonismes des souches isolées vis-à-vis d'un certain nombre de germes cibles.

Germes cibles

Champignons

- *Mucor ramannianus* (NRRL.1829)
- *Aspergillus niger* (N 939)
- *Fusarium polyferatum*

Les souches de champignons proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie de l'ENS de Kouba dirigé par le P^r Sabaou.

Levure

- *Candida albicans* (ATCC 1024) (Kouba)

Bactéries

Bactéries gram positives

- *Micrococcus luteus* (ATCC 9314) (ENS Kouba)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (Saïdal)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (Saïdal)

Bactéries gram négatives

- *Escherichia coli* (NAR: Nalidixic Acid resistant) (LMA)
- *Klebsiella pneumoniae* (E47) (LMA)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Institut Pasteur)

Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne est réalisée selon 03 méthodes :

Test des stries croisées

D'après **Nouredine (2006)** une souche d'actinomycète est ensemencée en un seul trait. Après incubation, les microorganismes cibles sont à leur tour inoculés par stries perpendiculaires à l'actinomycète.

Test des cylindres d'agar

D'après **Boughachiche et al., 2005**, des cylindres de cultures d'actinomycètes sont prélevés et déposés sur milieu Muller-Hinton gélosé ensemencé en surface avec une bactérie-test. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 heures d'incubation à 37°C.

Test des puits

D'après **El-sersy et Abou-elela (2006)** les fonds de chaque puits ont été couverts par deux gouttes de gélose blanche stérile. 50 µl du surnageant conservé ont été transférés dans chaque puits.

D'autre part, un gramme de mycélium d'actinomycètes est extrait par 10 ml de méthanol, sous agitation durant 2 h à température ambiante. Après filtration, 50 µl de cet extrait ont été transférés dans un puits et 50 µl de méthanol ont été transférés dans un autre puits de la même boîte.

1-7- Etude chimiotaxonomiqueMise en évidence de l'acide diaminopimélique et de la glycine

Des cellules ont été placées dans un tube avec 1ml d'acide chlorhydrique 6 N. Le tube a été fermé et a été mis à 100°C dans un four pour 18 h. Après refroidissement, l'hydrolysate a été filtré à travers un papier Whatman n°1. Le filtrat a été évaporé à sec, redissout dans un ml d'eau distillée, et séché de nouveau. Ce résidu a été dissout dans

0.3 ml d'eau distillée, et un volume de cet hydrolysate a été appliqué sur la zone de dépôt d'une plaque chromatographique sur couche mince (C.C.M).

Une C.C.M ascendante a été faite avec le système de solvants : méthanol - eau distillée- HCl 6N- pyridine (80 :26 :4 :10, vol/vol) pour approximativement 3,5 h. Après que le chromatogramme a été séché à l'air, les spots ont été visualisés en vaporisant avec de la ninhydrine (dans l'acétone) et en chauffant 3 min à 100°C (**Staneck et Roberts, 1974**).

Etude de la présence de sucres caractéristiques

Des cellules ont été placés dans un tube avec de l'acide sulfurique 1 N. Le tube a été chauffé pour 2 h. Après refroidissement, l'hydrolysate a été transféré dans un tube de centrifugation, et l'hydroxyde de baryum saturé a été ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que le pH était entre 5.2 et 5.5. Le précipité a été éliminé par centrifugation et abandonné. Le surnageant a été évaporé, et le résidu a été redissout dans 0.3 ml d'eau distillée, 1 µl de cet hydrolysate a été appliqué sur la zone de dépôt d'une plaque chromatographique sur couche mince (C.C.M) aussi bien qu'un µl de galactose et d'arabinose (chacun à une concentration de 1%).

Une C.C.M ascendante a été faite avec le système de solvants : n-butanol- eau distillée- pyridine- toluène (10 : 6 : 6 : 1, vol/vol) pour approximativement 4 h (**Staneck et Roberts, 1974**).

En absence d'acide phtalique, et pour visualiser les spots nous avons utilisé un autre révélateur composé d'acide phosphorique 20 ml, de diphénylamine : 4 g, d'acétone : 200 ml, et d'aniline : 4 ml.

Partie pratique

Résultats et discussion

2- Résultats et discussion

2-1- Isolement

Souches isolées

Quatre souches d'actinomycètes Gram positives et présentant un aspect filamenteux ont été isolées après 21 jours d'incubation à 28°C.

Sélection

Uniquement trois souches ont été retenues. Vu que, l'activité antimicrobienne n'a pu être mise en évidence qu'avec celles-ci. Il s'agit des souches codées B, OG, et R.

Ce travail a concerné également le repiquage (réisolement) de deux souches isolées par Alouache et Belhatri (2007) au sein du laboratoire de biochimie microbienne sous la direction du D^r Kecha. Il s'agit des souches S15 et S25.

Milieu de culture et germes isolés

Le milieu nitrate amidon utilisé

Le milieu nitrate amidon utilisé, pour l'isolement des actinomycètes contient de l'amidon comme source de carbone et des nitrates comme source d'azote. Ce milieu semble favoriser l'isolement de souches de streptomycètes.

En effet, selon **Rintala (2003)**, les streptomycètes, à la différence de nombreuses autres bactéries, sont capables d'utiliser de nombreux biopolymères et se satisfont d'une source d'azote inorganique tel que le nitrate. En plus, des milieux d'isolement contenant de l'amidon ou du glycérol comme source de carbone et du nitrate, de la caséine ou de l'arginine comme source d'azote se sont avérés être les milieux de croissance les plus efficaces pour l'isolement sélectif des streptomycètes.

Al-zarban et al. (2002) ont utilisé une concentration de 10% de NaCl. Cependant, une concentration de 5% de NaCl a été utilisée suite à l'échec des premières tentatives pour l'isolement d'actinomycètes en utilisant une concentration de 10% de NaCl.

Ces mêmes auteurs n'ont pas mentionné l'utilisation d'antifongiques ni celle d'antibactériens. En effet, ce milieu a permis l'isolement des actinomycètes sans l'utilisation d'agents antimicrobiens.

Le genre *Streptomyces*

Predominance du genre *Streptomyces* par rapport aux divers genres d'actinomycètes dans le sol

Le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95% des souches d'actinomycètes isolées (Theilleux, 1993). Alors que, selon Narayana et al. (2007), au moins 90% des actinomycètes isolés du sol ont été rapportés d'être des *Streptomyces spp.*

En plus, selon Egan et al. (1998), les espèces du genre *Streptomyces* sont facilement isolées du sol.

Ceci est compatible avec le fait que les trois souches, isolées à partir d'échantillons de sol en utilisant le milieu nitrate amidon avec 5% de NaCl, sont très probablement des souches du genre *Streptomyces*.

Selon Meyers et al. (2003), malgré le fait que les streptomycètes ont été largement étudiés pour plusieurs décennies et que de nombreuses espèces ont été décrites, de temps en temps, un nouveau streptomycète est isolé. Tel que :

a- *Streptomyces sp. CS684*, un nouveau membre des actinomycètes qui est capable de produire un antibiotique contre MRSA/VRE (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/vancomycin-resistant enterococci), récemment isolé d'un Sol coréen (Simkhada et al., 2009).

b- Une nouvelle souche d'actinomycète, désignée AP19-2, a été isolée à partir des selles de pandas géants. Des études des caractéristiques culturales suggèrent fortement que cette souche est un membre du genre *Streptomyces*. Cette souche a inhibé toutes les souches testées de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA) (Wu et al., 2007).

Malgré le fait que le genre *Streptomyces* a été largement étudié, ce genre est toujours intéressant comme source importante d'antibiotiques.

2-2- Caractérisation des isolats

2-2-1- Etude macromorphologique

Apparence des souches sur les milieux de cultures solides

La souche d'actinomycète B



Figure 3. Photographie de la souche B sur le milieu nitrate amidon à 5% de NaCl.

D'après la figure 4, on note que le contour de la colonie est fibrillaire et sa surface est poudreuse. Selon **Antonova-Nikolova et al. (2005)**, le contour de la colonie de la souche de *Streptomyces* 3B qu'ils ont étudiée peut être fibrillaire en fonction de son âge.



Figure 4. Photographie de la souche B sur milieu nitrate amidon à 5% de NaCl vu de DESSOUS [après un mois d'incubation (mycélium de substrat)].

D'après les photographies précédentes on remarque que l'apparence de la souche d'actinomycète B [après son repiquage sur une nouvelle boîte de Pétri (contenant également le milieu nitrate amidon avec 5% de NaCl) et après le vieillissement des colonies], diffère de celle observée sur la boîte qui a servi pour son isolement.

En plus, le dessous de la colonie sur la boîte qui a servi pour son isolement est orange vif alors que dans le premier cas il est brun foncé. En effet, selon **Antonova-**

Nikolova et al. (2005), la coloration du mycélium végétatif de la souche de *Streptomyces* 3B qu'ils ont étudiée a varié selon l'âge de la culture.

La Souche d'actinomycète R



Figure 5. Photographie de la souche R sur le milieu nitrate amidon à 5% de NaCl.

Comme dans le cas de la souche B, l'apparence de la souche R diffère selon l'âge de la culture lorsqu'elle est transférée sur un milieu neuf.

De plus, le dessous de la colonie sur la boîte qui a servi pour son isolement est orange vif alors que dans le second cas il est rouge profond.

La Souche d'actinomycète OG

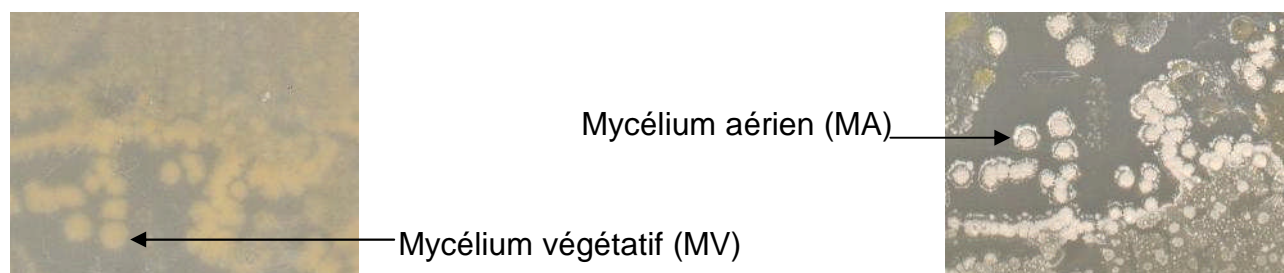


Figure 6. Apparence du MV et du MA de la souche OG (milieu nitrate amidon, 5% de NaCl).

On remarque que le MV des colonies de la souche OG, sur une boîte contenant le milieu nitrate amidon avec 5% de NaCl après vieillissement des colonies, est jaune brillant.

La surface des colonies est blanche. On note également que celle-ci est poudreuse. Selon **Zerizer et al., 2006**, les colonies de la souche de *Streptomyces* A₁ qu'ils ont étudiées sont poudreuses.

La souche d'actinomycète S25

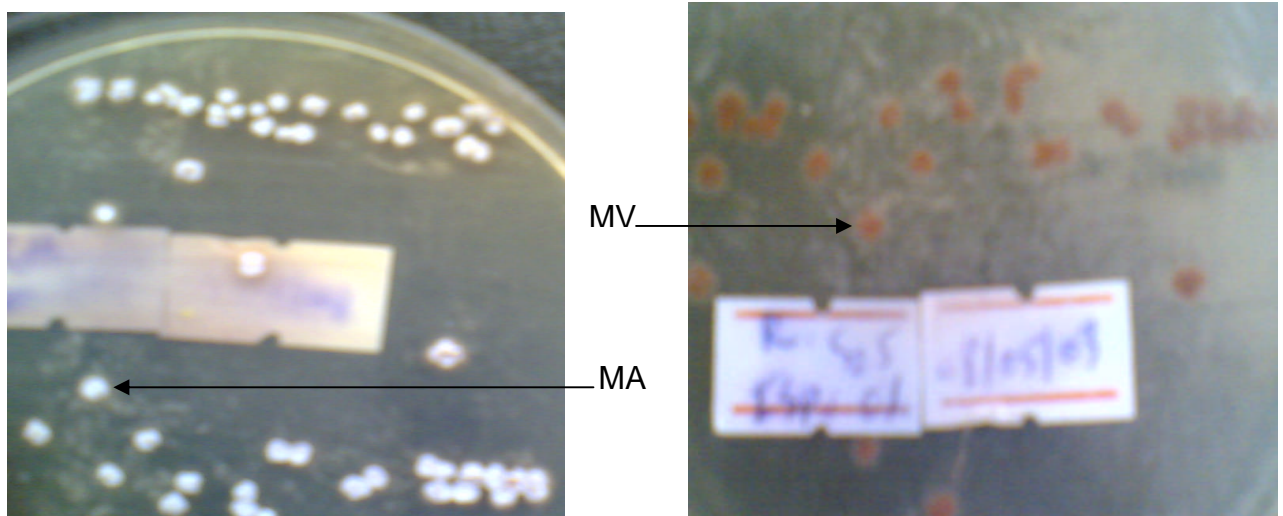


Figure 7. Apparence du MA et du MV de la souche S25 sur le milieu ISP1 ($\text{pH}=7,2$, 0% de NaCl).

On remarque que le mycélium végétatif des colonies de la souche S25 est orange brunâtre. Alors que, son mycélium aérien est blanc. La surface des colonies est poudreuse.

La souche d'actinomycète S15

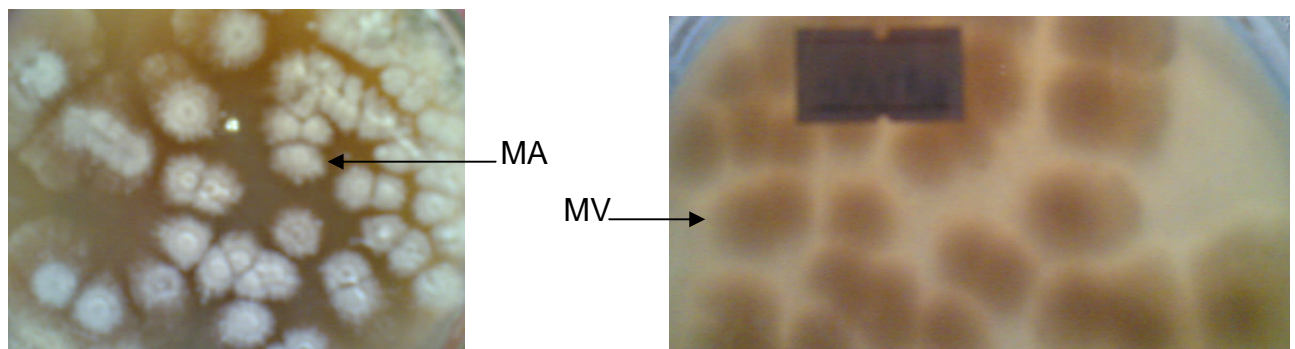


Figure 8. Apparence du MA et du MV de la souche S15 sur milieu M2 (7,5g/l de NaCl).

On remarque que le MV des colonies de la souche S15 sur le milieu M2 est orange modéré. Alors que, son MA est blanc. La surface des colonies est poudreuse.

Production de pigments solubles**La souche d'actinomycète B**

Le changement de la couleur du milieu nitrate amidon après ensemencement de la souche B est illustré par les photos suivantes :

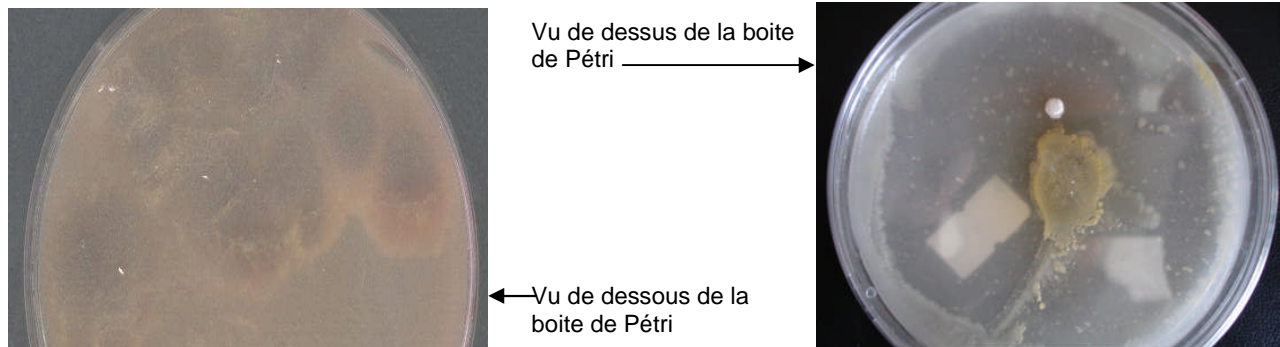


Figure 9. Couleur du milieu nitrate amidon (5% de NaCl, après environ 30 jours d'incubation).

Figure 10. Couleur du milieu nitrate amidon (5% de NaCl, après environ 15 jours d'incubation).

On remarque que le milieu nitrate amidon avec 5% de NaCl est devenu brun clair après vieillissement des colonies de la souche B. Ceci peut être expliqué par le fait que les colonies ont produit un pigment brun qui a diffusé dans le milieu et qui est à l'origine de la coloration de ce dernier.

Pigmentation des souches sur différents milieux de cultureCouleur des mycéliums aérien et de substrat

Depuis le début de la taxonomie des streptomycètes, la description des couleurs des mycéliums aériens et végétatifs a été importante pour la caractérisation des souches (Lyons et Pridham, 1965).

Couleur du mycélium aérien

Celle-ci est l'étape primaire de base pour classer les souches (Kumar et al., 2005). Le nombre d'espèces de Streptomyces est tellement élevé que celles-ci sont classées, justement, d'après la couleur du MA (Sabaou, 1988).

Couleur du mycélium du substrat

Dans le cas des Streptomyces, les espèces peuvent produire un MS de couleur caractéristique et dans ce cas la couleur doit être précisée car elle intervient dans la différenciation des espèces, ou bien non caractéristique et dans ce cas, elle n'a aucune valeur taxonomique (Sabaou, 1988).

La pigmentation des souches isolées sur différents milieux est présentée dans le tableau 4 (voire annexe III).

D'après ce tableau, on constate que la surface des souches est pratiquement de couleur blanche. Alors que, la couleur du MV des colonies peut être différente d'un milieu à un autre. En effet, selon **Antonova-Nikolova et al. (2007)**, la couleur du mycélium du substrat de la souche de *Streptomyces* 34-1 qu'ils ont étudiée a varié selon la composition du milieu et l'âge de la culture. L'abondance et la couleur de son mycélium aérien dépendent aussi de la composition du milieu et l'âge de la culture.

C'est uniquement sur le milieu ISP2 avec 0% de NaCl où l'on constate une croissance relativement bonne de toutes les souches. Ceci est compatible avec les observations d'**Antonova-Nikolova et al. (2005)**.

La détermination de la couleur du mycélium aérien serait plus adéquate sur le milieu ISP2 à 0% de NaCl.

2-2-2- Etude micromorphologique

Les cinq souches que nous avons étudiées appartiennent à la section « Rectus-Flexibilis » : RF (voir annexe). Des chaînes de spores mûres, sont droites à flexueuses. Les sporophores sont non verticillés. On note également l'absence de structures particulières.

2-2-3- Etude physiologique

Les critères physiologiques sont très importants pour l'identification des espèces. Ils consistent en des tests de dégradation de nombreuses substances, des glucides, des lipides, des protéines, ... (**Sabaou, 1988**).

2-2-3-1- L'influence du pH sur la croissance des isolats

Croissance des isolats sur le milieu ISP1 à pH=5 et à pH=10 (avec 0% de NaCl)

Le tableau suivant représente la croissance des isolats sur milieu ISP1 à pH=5 et à pH=10 (0% de NaCl).

Tableau 5. Croissance des isolats sur le milieu ISP1 à pH=5 et à pH=10 (à 0% de NaCl)

Milieu	Isolat	MA	MS
ISP1 à pH=5 (0% de NaCl)	S15	Blanche	Brun foncé
	B	Blanche	Jaune vif
	OG	Pas de croissance	Pas de croissance
	R	Blanche	Jaune vif
	S25	Blanche	Brun foncé
ISP1 à pH=10 (0% de NaCl)	S15	Blanche	Rouge vif
	B	Blanche	Orange vif
	OG	Pas de croissance	Pas de croissance
	R	Blanche	Blanc
	S25	Blanche	Rouge vif

On remarque que seul l'actinomycète OG n'a pas poussé à pH=5 et à pH=10. Les autres isolats ont pu se développer.

On remarque aussi que la couleur du verso (ou MV) des colonies de tous les isolats a varié en passant du pH=5 au pH=10. On peut déduire que le changement du pH a affecté la couleur du verso des colonies des isolats qui ont présenté une croissance.

2-2-3-2- Production de pigments mélanoïdes

Les actinomycètes synthétisent et excrètent parfois un pigment, la mélanine, qui est considéré comme critère utile pour des études taxonomiques (**Dastager et al., 2006**).

La couleur du milieu ISP7 (0% de NaCl)

La couleur du milieu ISP7 (0% de NaCl) après ensemencement des isolats est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 6. Couleur du milieu ISP7 (0% de NaCl)

Milieu	Actinomycète ensemencé	Couleur
ISP7	B	brun profond
	OG	brun clair
	S15	brun franc
	S25	brun franc
	R	brun franc
	témoin	Blanc

D'après les résultats concernant l'étude de la production de pigments mélanoides, l'actinomycète B pourrait présenter un intérêt du fait qu'il a produit un pigment brun éventuellement mélanoïde. Vu que selon **Dastager et al. (2006)**, les mélanines sont fréquemment utilisées en médecine, pharmacologie, et dans des préparations cosmétiques.

2-2-3-3- Production de nitrate réductase

L'analyse du génome de *Streptomyces coelicolor* a révélé la présence de trois opérons codants pour des NARs respiratoires (nitrate réductases respiratoires). La présence d'une enzyme dans la respiration anaérobie suggère que *S. coelicolor* a, au moins, la capacité de se développer ou produire de l'énergie, en utilisant le nitrate comme accepteur d'électrons dans des conditions limitées en oxygène. La réduction du nitrate a été démontrée pour un certain nombre de *Streptomyces spp* (**Keulen et al., 2005**).

Dans notre cas, le réactif de Griess prend une teinte rouge en présence d'ions nitrites. L'apparition de cette teinte dans le milieu signe la présence d'ions nitrites. Cela signifie que la bactérie possède une nitrate réductase et que cette dernière est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites.

En revanche, l'absence de coloration rouge ne signifie pas que la bactérie étudiée ne possède pas de nitrate réductase. En effet, il est possible qu'une bactérie possède une nitrate réductase capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote (anonyme 2).

Les résultats concernant l'étude de la production de nitrate réductase sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 7. Résultats concernant l'étude de la production de nitrate réductase par les cinq souches

Actinomycète	OG	B	R	S15	S25
Production de nitrate réductase	-	+	+	+	NT

+ : Production de nitrate réductase. - : Non production de nitrate réductase. NT : Non testé.

Les actinomycètes B et R ont réduit les nitrates en nitrites. Alors que, l'actinomycète S15 a réduit les nitrates jusqu'au stade diazote.

Selon **Keulen et al. (2005)**, les actinomycètes B, R, et S15 possèdent probablement la capacité de se développer ou produire de l'énergie, en utilisant le nitrate comme accepteur d'électrons dans des conditions limitées en oxygène, vu qu'elles ont produit une nitrate réductase.

2-2-3-4- Dégradation de la caséine du lait

Les protéases sont parmi les enzymes utilisées en industrie. Elles représentent près de 60% des ventes totales d'enzymes à l'échelle mondiale (**Esawy et al., 2007**). Les protéases bactériennes sont industriellement les plus significatives par rapport aux protéases fongiques ou animales. Elles sont principalement utilisées dans les détergents (**Rifaat et al., 2007**).

La dégradation de la caséine est indiquée par l'apparition d'une auréole claire autour des colonies (**Nouredine, 2006**).

La dégradation de la caséine par l'actinomycète R

L'apparition d'une auréole claire autour d'une colonie de l'actinomycète R a été observée dans une boîte de Pétri, ce résultat est illustré par les photos suivantes :

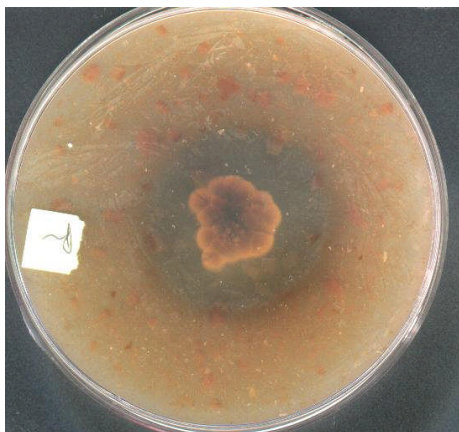


Figure 11. Dégradation de la caséine par l'actinomycète R.

La dégradation de la caséine par l'actinomycète OG

L'apparition d'une auréole claire autour des colonies de l'actinomycète OG a été observée dans une boîte de Pétri, ce résultat est illustré par les deux photos suivantes :

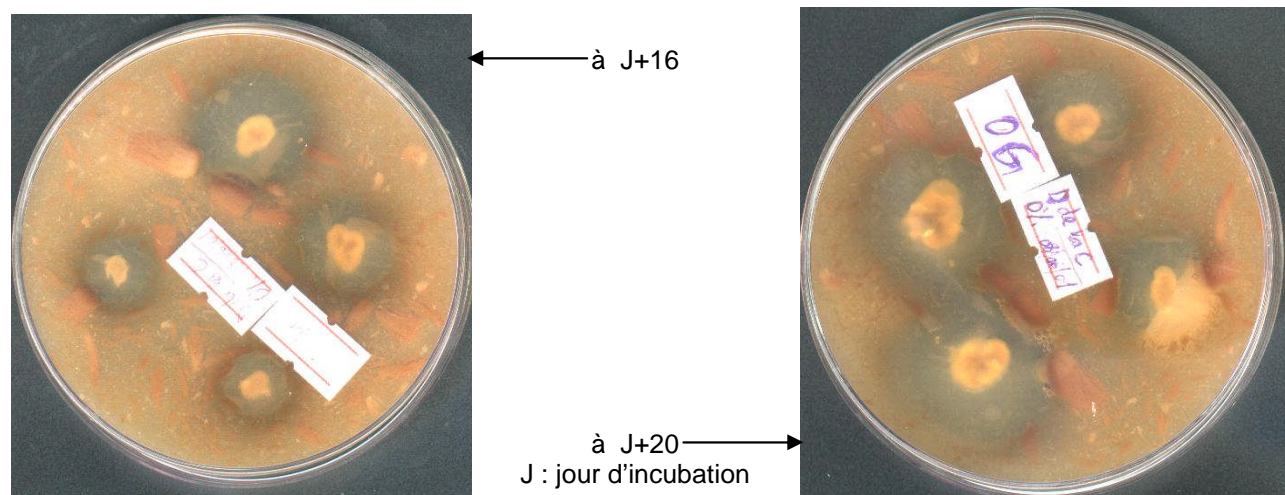


Figure 12. Dégradation de la caséine par l'actinomycète OG.

D'après les résultats de la dégradation de la caséine concernant l'actinomycète OG on remarque que plus la période d'incubation est grande plus le diamètre de la zone claire autour des colonies est grand. Ce ci pourrait être expliqué par le fait que l'enzyme dégradant la caséine du lait a diffusé plus dans le milieu de culture solide.

Les résultats concernant la dégradation de la caséine du lait sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 8. Résultats concernant la dégradation de la caséine du lait

Actinomycète	OG	B	R	S15	S25
Dégradation de la caséine du lait	+	-	+	-	-

+ : Dégradation de la caséine du lait. - : Non dégradation de la caséine du lait.

Les actinomycètes R et OG pourraient être intéressantes du fait qu'elles ont produit très probablement une caséinase qui est une protéase. Selon **Antonova-Nikolova et al. (2005)**, les protéases trouvent des applications dans la production de détergents, d'aliments, du cuir, de la soie, de préparations chimiques et agricoles. En plus, au cours des dernières années elles ont été utilisées avec succès en médecine.

2-2-3-5- Température de croissance

Les résultats de la croissance des isolats à différentes température sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau 9. Croissance à différentes températures des isolats d'actinomycètes :

Actinomycète Température	B	OG	S15	S25	R
28°C	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	-
45°C	-	+	-	-	-
50°C	-	+	-	-	-

+ : Croissance ; - : Absence de croissance

Du tableau précédent on remarque que tous les isolats ont présenté une croissance à 37°C. La croissance à 40°C n'a été observée qu'avec les actinomycètes B, OG, S15 et S25. Alors que la croissance à 45°C et à 50°C n'a été observée qu'avec l'actinomycète OG.

Discussion

D'après les résultats de la croissance à différentes températures et ceux concernant la dégradation de la caséine du lait, on déduit que l'actinomycète OG est probablement plus intéressant que l'actinomycète R d'un point de vue production de caséinase (protéase), étant donné que, selon **Petrosyan et al. (2003)**, actuellement, plus d'attention est accordée aux streptomycètes thermophiles, en raison de leur importance potentielle en technologie microbienne. En effet, selon **Patke et Dey (1998)**, les enzymes thermostables offrent des vitesses de réaction plus élevées, une demi-vie et une stabilité opérationnelle plus grandes, une résistance plus grande envers des solvants organiques, et des risques de contamination plus faibles au cours de la fermentation.

2-2-3-6- Tolérance des isolats au chlorure de sodium

Les résultats concernant la tolérance des isolats au chlorure de sodium sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau 10. Tolérance des isolats au chlorure de sodium

Isolat % en NaCl	B	OG	S15	S25	R
0 %	+	+	+	+	+
5 %	+	+	ND	ND	+
10 %	+	+	+	ND	+
15 %	+	-	+	+	-
20 %	-	-	+	+	-
30 %	ND	ND	-	ND	ND

+ : Croissance; - : Absence de croissance ; ND : Non déterminé.

Tous les isolats ont présenté une croissance sur un milieu contenant 10 % de NaCl. La croissance à 15 % de NaCl a été observée avec les actinomycètes B, S15 et S25. Alors que la croissance à 20 % de NaCl n'a été observée qu'avec les actinomycètes S15 et S25.

De la remarque précédente on déduit que d'un point de vue tolérance au chlorure de sodium tous les actinomycètes étudiés sont intéressants.

Influence de la concentration en NaCl sur la croissance des isolats

La durée d'incubation minimale nécessaire pour l'observation d'un début de croissance des isolats à 28°C en fonction du milieu d'ensemencement est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 11. Durée d'incubation minimale nécessaire pour l'observation d'un début de croissance des isolats à 28°C en fonction du milieu d'ensemencement.

Actinomycète	milieu d'ensemencement	Durée d'incubation minimale nécessaire pour l'observation d'un début de croissance des isolats à 28°C
B	Milieu utilisé pour l'étude de l'hydrolyse de la gélatine avec 0% de NaCl	3 jours
B	ISP1 ; 0% de NaCl	3 jours
B	Milieu nitrate amidon ; 0% de NaCl	4 jours
B	Milieu nitrate amidon ; 5% de NaCl	5 jours
R	ISP1 ; 0% de NaCl	3 jours
R	Milieu nitrate amidon ; 0% de NaCl	4 jours
R	Milieu nitrate amidon ; 5% de NaCl	6 jours
O G	ISP1 ; 0% de NaCl	3 jours
O G	Milieu nitrate amidon ; 5% de NaCl	6 jours
S 25	M2 ; 7.5 g/l de NaCl	5 jours
S 25	M2 ; 6,5% de NaCl	6 jours
S 15	M2 ; 7.5 g/l de NaCl	5 jours
S 15	M2 ; 6,5% de NaCl	6 jours

Du tableau précédant on remarque que plus la concentration en NaCl du milieu de culture est élevée plus la durée d'incubation minimale nécessaire pour l'observation d'un début de croissance des isolats à 28°C est longue.

2-2-3-7- Sensibilité au cristal violet et/ou à un mélange de sels biliaires

Sur le milieu VRBL, contenant du cristal violet et un mélange de sels biliaires, aucun isolat n'a manifesté de croissance après un mois d'incubation à 28°C.

L'absence de croissance sur le milieu VRBL peut être expliquée par le fait que les isolats seraient probablement sensibles au cristal violet et/ou à un mélange de sels biliaires.

2-2-3-8- Utilisation des sucres comme source de carbone

La dégradation des glucides est déterminée en notant la croissance sur un milieu minéral ISP 9 (**Sabaou, 1988**). Les sources de carbone testées sont : Glucose, fructose, galactose, lactose, maltose, cellulose, et saccharose.

Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence de glucides ou en leur absence (témoin négatif). Le milieu contenant du glucose sert de témoin positif (**Nouredine, 2006**). Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12. Tests d'utilisation des sucres comme seule source de carbone

Isolat \ Sucres testés	B	OG	S15	S25	R
Galactose	+	+	-	+	+
Fructose	+	+	+	-	+
Saccharose	+	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Cellulose	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
Témoin	-	-	-	-	-

+ : Croissance; - : Absence de croissance.

On constate que tous les isolats ont utilisé le maltose et le lactose comme seule source de carbone. En revanche, aucun n'a manifesté de croissance sur le milieu à cellulose. Le saccharose n'a été métabolisé que par l'actinomycète B. L'actinomycète S25 n'a pas manifesté de croissance sur le milieu contenant le fructose. L'actinomycète S15 n'a pu se développer sur milieu ISP9+galactose. On remarque également que c'est l'actinomycète B qui a utilisé le plus grand nombre de sucres comme unique source de carbone.

On peut déduire que l'actinomycète B a probablement une variabilité métabolique, pour l'utilisation des sucres, plus grande que celle des autres isolats.

2-2-3-9- Dégradation de la tyrosine

La dégradation de la tyrosine est indiquée par l'apparition d'une auréole claire autour des colonies (Nouredine, 2006).

Tableau 13. Résultats de la dégradation de la tyrosine

Actinomycète	OG	B	R	S15	S25
Dégradation de la tyrosine	+	+	-	+	ND

+ : Dégradation de la tyrosine. - : Non dégradation de la tyrosine. ND : Non déterminé.

Des résultats précédents, concernant la dégradation de la tyrosine, on peut déduire que les actinomycètes OG, B, et S15 ont probablement produit une tyrosinase.

2-2-3-10- Dégradation de la xanthine

La dégradation de la xanthine est indiquée par l'apparition d'une auréole claire autour des colonies (Nouredine, 2006).

Tableau 14. Résultats de la dégradation de la xanthine

Actinomycète	OG	B	R	S15	S25
Dégradation de la xanthine	-	+	+	+	+

+ : Dégradation de la xanthine. - : Non dégradation de la xanthine.

Des résultats précédents on peut déduire que les actinomycètes OG, B, S15 et S25 ont probablement produit une enzyme qui a dégradé la xanthine.

2-2-3-11- Dégradation du tween80

Les tweens ont été les substrats les plus largement utilisés pour la détection de microorganismes lipolytiques dans des milieux avec agar. Dans la famille des tweens, le tween80 est le plus largement utilisé (Plou et al., 1998). La dégradation du tween80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies (Nouredine, 2006).

Tableau 15. Résultats de la dégradation du tween80

Actinomycète	OG	B	R	S15	S25
Dégradation du tween80	+	-	-	-	-

+ : Dégradation du tween80 ; - : Non dégradation du tween80.

Etant donné que pour étudier l'hydrolyse du tween80, ce dernier a été ajouté à un milieu contenant une solution saline, du $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 et de l'extrait de levure. D'après **Plou et al. (1998)**, l'auréole opaque observée autour des colonies de l'actinomycète OG résulte probablement de la précipitation des acides gras libérés du tween80, comme sels de calcium, suite à l'action d'une lipase (estérase). Cette dernière a été produite par l'actinomycète OG.

L'actinomycète OG pourrait présenter une certaine importance du fait qu'elle a probablement produit une lipase. Vu que, selon **Fickers et al. (2008)**, les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, de permettre des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale et d'autre part, d'avoir une plus grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux.

2-2-3-12- Tests complémentaires

Les résultats concernant la dégradation de la gélatine, de l'urée, de l'oxalate de sodium ainsi que la production de catalase sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 16. Résultats des tests complémentaires

Actinomycète Test	OG	B	R	S15	S25
Dégradation de la gélatine	-	-	-	-	-
Production de catalase	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'urée	-	-	-	-	-
Dégradation de l'oxalate de sodium	-	-	-	-	-

Pour conclure, on constate que :

- ▶ La surface des isolats est de couleur blanche sur le milieu ISP2 avec 0% de NaCl. Tous les isolats peuvent donc être classés dans la série des « blancs ».
- ▶ Tous les isolats ont produit un pigment brun (éventuellement mélanoïde).
- ▶ Des colonies de l'actinomycète B ont présenté un MV orange vif qui est une couleur caractéristique.
- ▶ Des colonies des actinomycètes S15 et S25 ont présenté un MV brun foncé qui est une couleur caractéristique.
- ▶ Des colonies de l'actinomycète OG ont présenté un MV jaune vif qui est une couleur caractéristique.
- ▶ Des colonies de l'actinomycète R ont présenté un MV rouge vif ou brun foncé qui sont des couleurs caractéristiques.
- ▶ Seul l'actinomycète B a produit sur le milieu nitrate amidon avec 5% de NaCl un pigment soluble brun clair. Mais ce pigment n'est pas caractéristique.
- ▶ Les cinq actinomycètes appartiennent à la section « Rectus-Flexibilis » : RF.
- ▶ Seul l'actinomycète S25 n'a pas manifesté de croissance sur le milieu contenant le fructose comme seule source de carbone.

2-3- Etude de l'activité antimicrobienne

Activité antimicrobienne de l'actinomycète R

Test des puits

Le test des puits a donné les résultats suivants :



Figure 13. Activité antimicrobiennede l'actinomycète R vis-à-vis de *Micrococcus luteus*

Une zone d'inhibition de 10 mm de diamètre a été observées vis-à-vis de *Micrococcus luteus*.

Activité antimicrobienne de l'actinomycète B

Test des stries croisées

Le test des stries croisées a donné le résultat suivant :

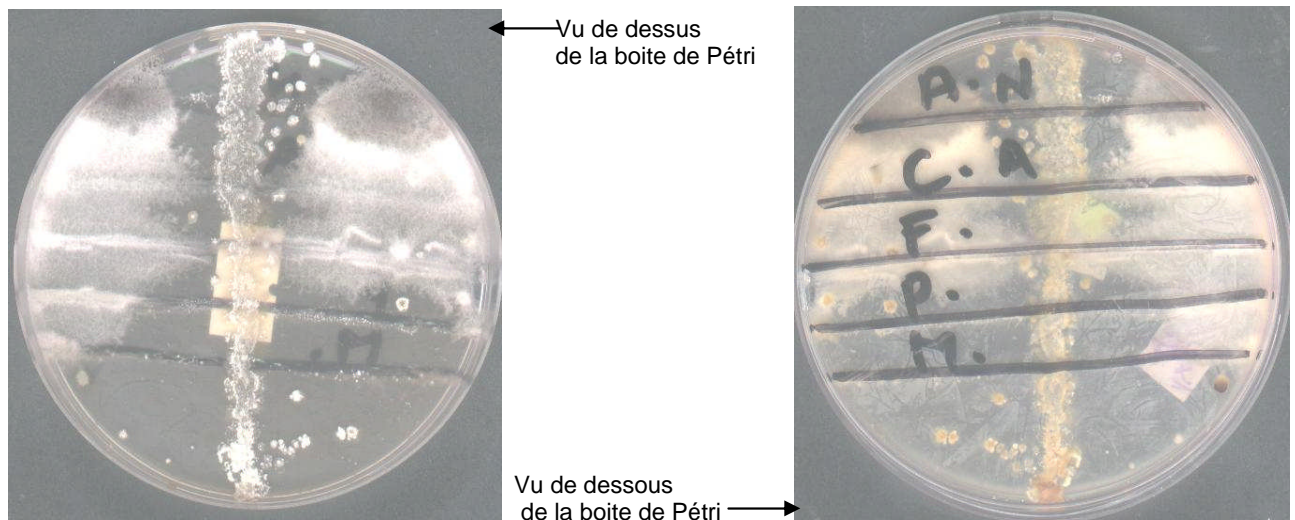


Figure 14. Résultat du test des stries croisées de l'actinomycète B vis-à-vis de germes cibles fongiques et d'une levure.

Une zone d'inhibition de 10 mm de part et d'autre de l'actinomycète test a été observée contre *Aspergillus niger*.

Test des puits

Le test des puits a donné les résultats suivants :

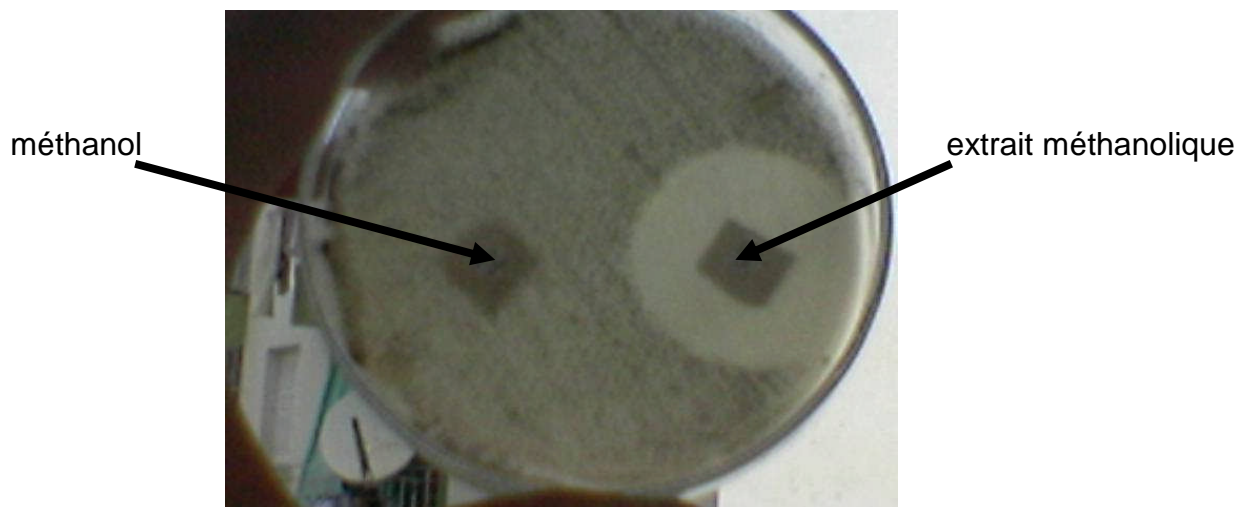


Figure 15. Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique du mycélium de l'actinomycète B vis-à-vis d'*Aspergillus niger*.

Une zone d'inhibition de 35 mm de diamètre a été observée vis-à-vis d'*Aspergillus niger*.

Activité antimicrobienne de l'actinomycète S15

Test des cylindres d'agar

Le test des cylindres d'agar a donné le résultat suivant :



Figure 16. Activité antimicrobienne de l'actinomycète S15 vis-à-vis de *Micrococcus luteus*.

Une zone d'inhibition de 25 mm de diamètre a été observée vis-à-vis de *Micrococcus luteus*.

Activité antimicrobienne de l'actinomycète S25

Test des cylindres d'agar

Le test des cylindres d'agar a donné le résultat suivant :

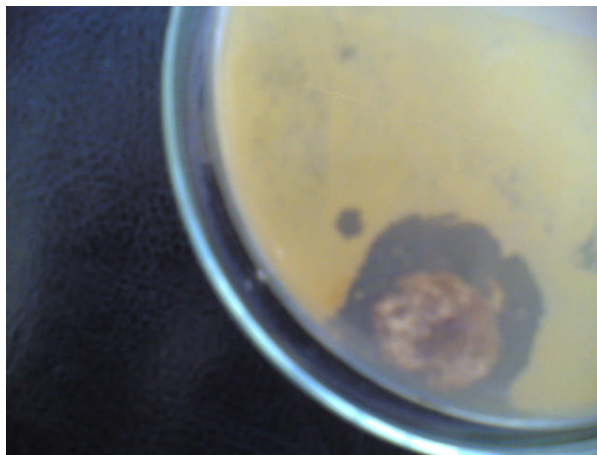


Figure 17. Activité antimicrobienne de l'actinomycète S25 vis-à-vis de *Micrococcus luteus*.

Une zone d'inhibition de 25 mm de diamètre a été observée vis-à-vis de *Micrococcus luteus*.

Activité antimicrobienne de l'actinomycète OG

Test des puits

Le test des puits a donné les résultats suivants :

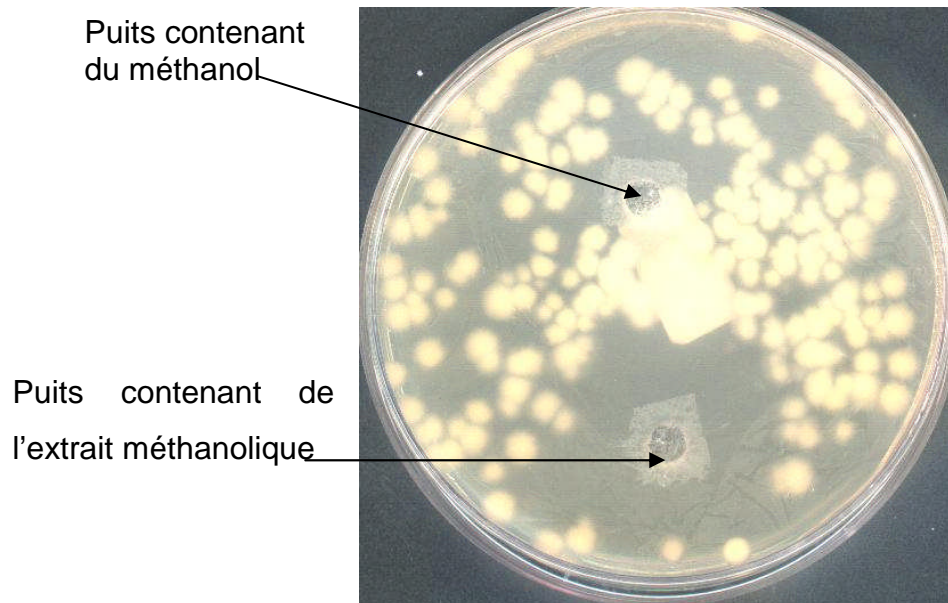


Figure 18. Activité antifongique de l'extrait méthanolique du mycélium de l'actinomycète OG vis-à-vis de *Mucor ramanianus*.

une zone d'inhibition de 25 mm de diamètre a été observée vis-à-vis de *Mucor ramanianus*. Mais dans ce cas le méthanol a présenté une zone d'inhibition de 10 mm de diamètre.

Importance relative de l'actinomycète B

D'un point de vue tolérance au chlorure de sodium, tous les actinomycètes étudiés sont intéressants. Alors que, point de vue activité antimicrobienne l'actinomycète B, a présenté la zone d'inhibition la plus importante vis-à-vis d'*Aspergillus niger*

Dans la synthèse bibliographique on a mis l'accent sur la nécessité de nouveaux antifongiques (pages 5 et 6). En particulier, selon **Nouasri (1996)**, pour certaines aspergilloses, on ne dispose toujours pas de produits efficaces. En plus, d'après **Carle (2003)**, *Candida* et *Aspergillus* constituent les deux principaux types de champignons pathogènes.

Etant donné que ce travail s'intéresse à la sélection d'actinomycètes halotolérants producteurs de substances antimicrobiennes, l'actinomycète B semble être l'isolat le plus intéressant. Il a fait alors l'objet d'une étude chimiotaxonomique pour affirmer son identification.

2-4- Chimiotaxonomie de l'actinomycète B

2-4-1- Etude de la présence de sucres Caractéristiques

La figure 19 montre une C.C.M réalisée pour l'étude de la présence de sucres Caractéristiques.

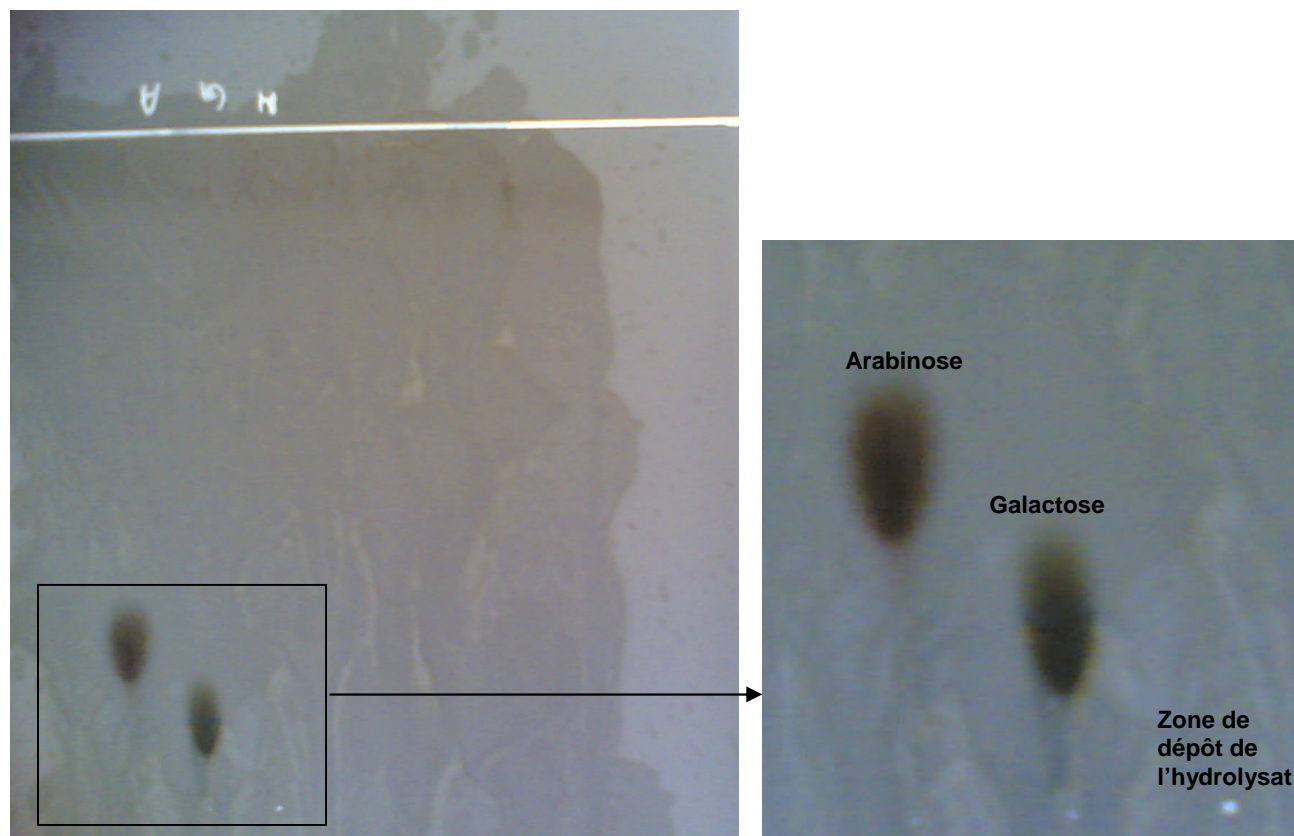


Figure 19. C.C.M réalisée pour l'étude de la présence de sucres caractéristiques (système éluant : n-butanol- eau distillée- pyridine- toluène (10 :6 :6 :1, vol/vol)).

D'après **Staneck et Roberts (1974)**, les spots d'hexoses sont jaunes après chauffage et les spots des pentoses marrons. En plus, le galactose a migré moins rapidement que l'arabinose.

Le révélateur des spots utilisé est différent de celui utilisé par **Staneck et Roberts (1974)**. Mais de la C.C.M précédente on constate que le spot d'arabinose (qui est un pentose) était marron après chauffage et il a migré plus loin que le spot du galactose. Par ailleurs, le spot du galactose (qui est un hexose) était bleu, après chauffage, mais lorsque on regarde le dos de cette plaque chromatographique on remarque du jaune au niveau du spot du galactose, (comme si du jaune a été recouvert par du bleu). On constate aussi l'absence de sucres au niveau de l'hydrolysate acide de l'actinomycète B

2-4-2- Mise en évidence de l'acide diaminopimélique et de la glycine

La figure 20 montre une C.C.M pour la mise en évidence de l'acide diaminopimélique et de la glycine.

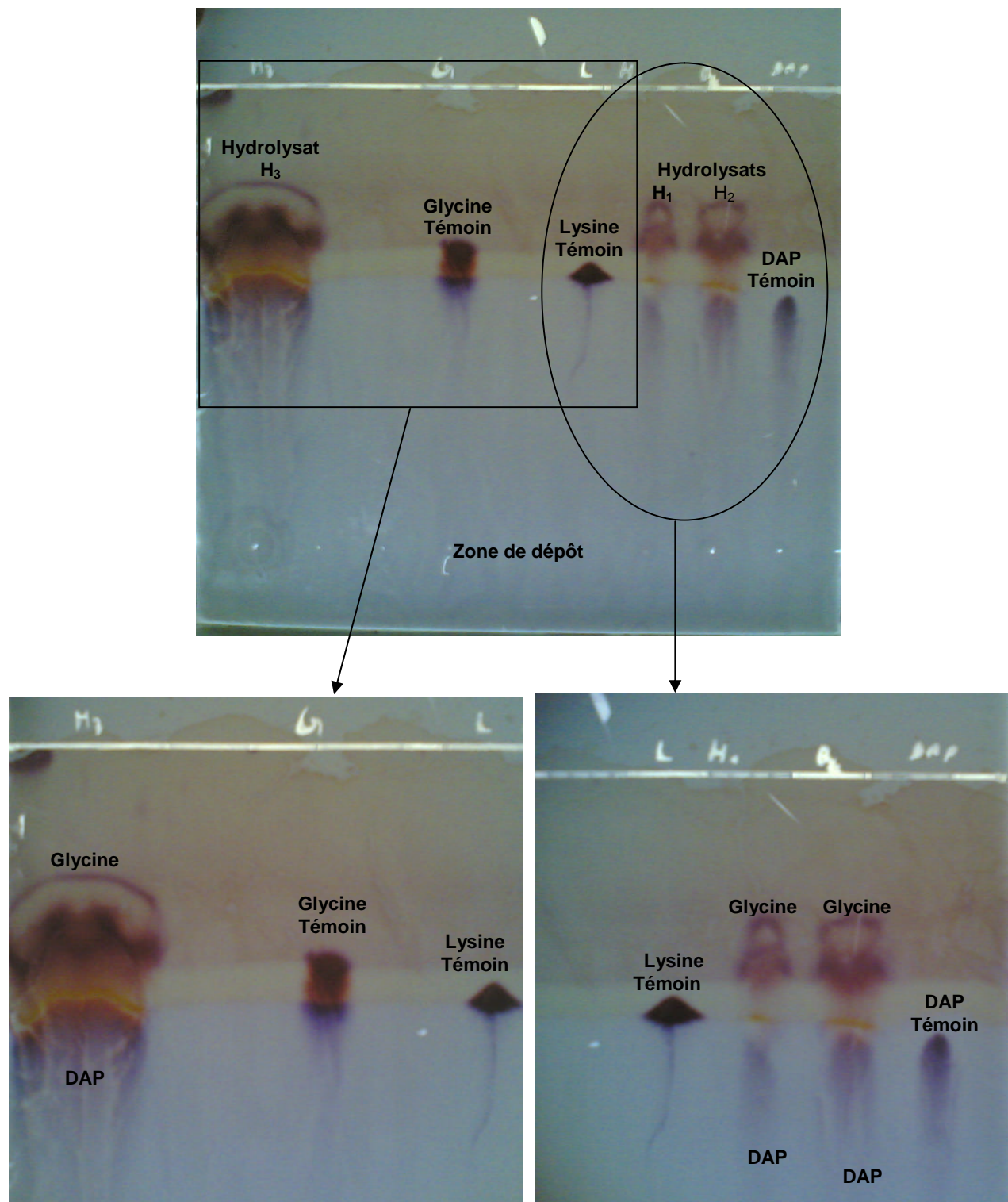


Figure 20. C.C.M ascendante pour la mise en évidence de l'acide diaminopimélique et de la glycine (système éluant : méthanol- eau distillée- HCl 6N- pyridine (80 :26 :4 :10, vol/vol)).

D'après **Staneck et Roberts (1974)**, les spots d'acides aminés apparaissent violets ou rouges et migrent devant le DAP. On constate que la glycine est rouge et a migré

devant le DAP. De même que, la lysine (violette) qui migre aussi devant le DAP. En ce qui concerne les trois échantillons de l'hydrolysate acide de l'actinomycète B on constate des bandes rouges qui ont migré devant le DAP et qui correspondent, très probablement, à la glycine.

De la C.C.M précédente on constate également que le spot du DAP a été violet comme celui de la lysine, cette dernière constatation diffère de celle de **Staneck et Roberts (1974)**. D'après ces derniers l'isomère L du DAP migre devant l'isomère meso. Donc on devrait avoir à partir du mélange LL et DL DAP deux bandes séparées l'une correspondant au LL-DAP et l'autre au DL-DAP. Cependant, le sommet du mélange LL-DAP et DL-DAP devrait très probablement correspondre à l'isomère LL du DAP.

D'après l'étude chimiotaxonomique de l'actinomycète B on peut déduire que cet isolat contient l'isomère LL du DAP et de la glycine et qu'il est caractérisé par l'absence de sucres caractéristiques. Ce qui suggère que c'est un *Streptomyces*.

Conclusion

Conclusion

A partir d'échantillons de sol avoisinant une source d'eau saline, dans la région d'Aith aloune dans le village Ighil Ouanter, trois actinomycètes ont été isolés en utilisant le milieu nitrate amidon avec 5% de NaCl. Ce milieu favorise l'isolement de souches de streptomycètes.

Dans la présente étude cinq souches de *Streptomyces* halotolérantes étaient l'objet d'une caractérisation physiologique. Cette dernière a permis de conclure que :

- ▶ Tous les actinomycètes étudiés sont intéressantes d'un point de vue tolérance au chlorure de sodium.

- ▶ Tous les isolats ont produit un pigment brun éventuellement mélanoïde sur le milieu ISP7.

- ▶ Les actinomycète B, R, et S15 ont probablement la capacité de se développer ou produire de l'énergie, en utilisant le nitrate comme accepteur d'électrons dans des conditions limitées en oxygène, vu qu'elles ont produit une nitrate réductase.

- ▶ Les actinomycètes R et OG pourraient être intéressantes du fait qu'elles ont produit très probablement une caséinase qui est une protéase.

- ▶ Tous les isolats seraient probablement sensibles au cristal violet et/ou à un mélange de sels biliaires.

- ▶ L'actinomycète B a assimilé le plus grand nombre de sucres comme unique source de carbone.

- ▶ Les actinomycètes OG, B, et S15 ont probablement produit une tyrosinase.

- ▶ Aucun isolat n'a dégradé ni la gélatine, ni l'urée, ni l'oxalate de sodium.

- ▶ Tous les isolats sont à catalase+.

La souche OG pourrait être intéressante en technologie microbienne étant donné qu'elle a probablement produit une tyrosinase, une caséinase, et une lipase. Vu que, la croissance à 45°C et à 50°C n'a été observée qu'avec l'actinomycète OG.

L'étude de l'activité antimicrobienne a révélé que l'actinomycète B semble être le plus intéressant du fait qu'il a présenté la plus importante zone d'inhibition vis-à-vis d'*Aspergillus niger*. Il a fait alors l'objet d'une étude chimiotaxonomique.

D'après l'étude chimiotaxonomique de l'actinomycète B on peut déduire que cet isolat contient l'isomère LL du DAP et de la glycine et qu'il est caractérisé par l'absence de sucres caractéristiques. Ce qui suggère que c'est un *Streptomyces*.

La molécule à l'origine de l'activité antifongique de la souche B peut être toxique pour les cellules animales. L'étude de la structure chimique des molécules actives après extraction et purification permet d'avoir une idée sur le degré de toxicité de ces molécules.

En plus des Sebkhass, il est intéressant d'exploiter le milieu marin afin d'augmenter la probabilité d'obtenir de nouvelles souches et ainsi celle d'obtenir de nouvelles molécules actives pour la substitution de celles qui sont inefficaces pour lutter contre le problème de la résistance microbienne.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Abbas, I.H., (2006).** A biological and biochemical studies of actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *Journal of Applied Science Research*, **2** (10), 809-815.
- **Abou-elela, G.M. and Ghanem, N.B., (2005).** Phenotypic characterization and numerical taxonomy of some actinomycetes strains isolated from Burullus lake. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **31** (2), 125-144.
- **Adams, J.D.W. and Frostick, L.E., (2009).** Analysis of bacterial activity, biomass and diversity during windrow composting. *Waste Management*, **29**, 598–605.
- **Albrecht, R., (2007).** Co-compostage de boues de station d'épuration et de déchets verts : nouvelle méthodologie du suivi des transformations de la matière organique. Thèse de doctorat. Université Paul Cezanne. France.
- **Al-zarban, S.S., Al-musallam, A.A., Abbas, I.H. and Fasasi, Y.A., (2002).** Noteworthy salt-loving actinomycetes from Kuwait. *Kuwait J. Sci. Eng*, **29** (1), 99-109.
- **Anderson, A.S. and Wellington, E.M.H., (2001).** The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 797–814.
- **Antonova-Nikolova, S., Stefanova, V. and Yocheva, L., (2007).** Taxonomic study of *Streptomyces* Sp. strain 34-1. *Journal of Culture Collections*, **5**, 10-15.
- **Antonova-Nikolova, S., Tzekova, N. and Yocheva, L., (2005).** Taxonomy of *Streptomyces* sp. strain 3B. *Journal of Culture Collections*, **4**, 36-42.
- **Anyanwutaku, I.O., Zirbes, E. and Rosazza, J.P.N., (1992).** Isoflavonoids from streptomycetes: Origins of genistein, 8-Chlorogenistein, and 6,8-Dichlorogenistein. *Journal of Natural Products*, **55** (10), 1498-1504.
- **Apichaisataienchote, B., Korpraditskul, V., Fotso, S. and Laatsch, H., (2006).** Aerugine, an antibiotic from *Streptomyces fradiae* strain SU-1. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* **40**, 335-340.
- **(Augustine et al., 2005 (1)). Augustine, S.K., Bhavsar, S.P. and Kapadnis, B.P., (2005).** A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J. Biosci*, **30** (2), 201–211.
- **(Augustine et al., 2005 (2)). Augustine, S.K., Bhavsar, S.P. and Kapadnis, B.P., (2005).** Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indian J Med Res*, **121**, 164-170.

- **Azab, E.A., Abdu El-Souod, S.M., El-Sayed, M.A. and Fareed, M.F., (2006).** Towards the biological control of post harvest blue mold of *Citrus sinensis* fruits in Egypt. I- isolation and characterization of antagonistic strain of *Streptomyces alni*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **9** (15), 2945-2956.

B

- **Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. et Sabaou, N., (2005).** Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*, **15**, 211-219.
- **Basilio, A., González, I., Vicente, M.F., Gorrochategui, J., Cabello, A., González, A. and Genilloud, O., (2003).** Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 814–823.
- **Becker, B., Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A., (1965).** Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, **13** (2), 236-243.
- **Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. and Hopwood, D.A., (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417**, 141-147.
- **Berche, P., Gaillard, J-L et Simonet, M., (1989).** Bactériologie. Bactéries des infections humaines. Collection de la biologie à la clinique. Flammarion Médecine-Sciences.
- **Biuković, G., (2004).** Biotransformation of fusidic acid and its related derivatives by *Streptomyces lividans*. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors. Universität Osnabrück. Deutschland.
- **Bonjar, G.H.S., Fooladi, M.H., Mahdavi, M.J. and Shahghasi, A., (2004).** Broadspectrim, a novel antibacterial from *Streptomyces* sp. *Biotechnology*, **3** (2), 126-130.

- **Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A. et Boulahrouf, A., (2005).** Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia de Ain Mlila. *Sciences & Technologie C* (23), 5-10.
- **Boulter, J.I., Boland, G.J. and Trevors, J.T., (2000).** Compost : A study of the development process and end-product potential for suppression of turfgrass disease. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **16**, 115-134.
- **Bush, K., (2004).** Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clin Microbiol Infect*, **10** (Suppl. 4), 10–17.
- **Busti, E., Monciardini, P., Cavaletti, L., Bamonte, R., Lazzarini, A., Sosio, M. and Donadio, S., (2006).** Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology*, **152**, 675–683.

C

- **Carle, S., (2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*, **36** (1), 25-41.
- **Castillo, M.A., Felis, N., Aragón, P., Cuesta, G. and Sabater, C., (2006).** Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **58**, 196-202.
- **Ceylan, O., Okmen, G. and Ugur, A., (2008).** Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *EurAsian Journal of BioSciences*, **2** (9), 73-82.
- **Cho, S-H., Han, J-H., Seong, C.N. and Kim, S.B, (2006).** Phylogenetic diversity of acidophilic sporoactinobacteria isolated from various soils. *The Journal of Microbiology*, **44** (6), 600-606.
- **Christova, K., Sholeva, Z. and Chipeva, V., (1995).** Application of molecular biological methods in taxonomy of genus Streptomyces. *Journal of Culture Collections*, **1**, 3 -10.
- **Chun, J., Bae, K.S., Moon, E.Y., Jung, S-O., Lee, H.K. and Kim, S-J., (2000).** *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 1909–1913.
- **Cole, E.C., Addison, R.M., Rubino, J.R., Leese, K.E., Dulaney, P.D., Newell, M.S., Wilkins, J., Gaber, D.J., Wineinger, T. and Criger, D.A., (2003).** Investigation of antibiotic and antibacterial agent cross-resistance in target bacteria

from homes of antibacterial product users and nonusers. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 664–676.

- **Colombié, V., (2005).** Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de doctorat, I.N.S.A Toulouse. France.
- **Cook, A.E. and Meyers, P.R., (2003).** Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 1907–1915.
- **Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M. and Ousley, M.A., (1993).** Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (11), 3899-3905.

D

- **Das, S., Lyla, P.S. and Khan, S.A., (2008).** Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **26** (2), 166-177.
- **Das, S., Lyla, P.S. and Khan, S.A., (2006).** Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*, **90** (10), 1325-1335.
- **Dastager, S.G., Wen-Jun, L., Dayanand, A., Shu-Kun, T., Xin-Peng, T., Xiao-Yang, Z., Li-Hua, X. and Cheng-Lin, J., (2006).** Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology*, **5** (8), 1131-1134.
- **Deák, E., (2004).** Study of the role of beta-lactamase enzyme and the effect of beta-lactam antibiotics in- *Streptomyces griseus* NRRL B-2682. Ph.D. Thesis. University of Debrecen. Hungary.
- **Dharmalingam, K. et Cullum, J., (1996).** Genetic instability in *Streptomyces*. *J. Biosci.*, **21** (3), 433-444.
- **Duval, J. and Soussy, C.J., (1990).** Antibiothérapie. Bases bactériologiques pour l'utilisation des antibiotiques. ABREGES. Masson 4^e edition.

E

- **Egan, S., Wiener, P., Kallifidas, D. and Wellington, E.M.H., (1998).** Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within streptomycetes isolated from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (12), 5061–5063.
- **El-Nakeeb, M.A. and Lechevalier, H.A., (1963).** Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol*, **11**, 75-77.

- **El-sersy, N.A. and Abou-Elela, G.M., (2006).** Antagonistic effect of marine *Nocardia brasiliensis* against the fish pathogen *Vibrio damsela*: Application of Plackett- Burman experimental design to evaluate factors affecting the production of the antibacterial agent. *International Journal of Oceans and Oceanography*, **1** (1), 141-150.
- **Endo, K., Hosono, K., Beppu, T. and Ueda, K., (2002).** A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology*, **148**, 1767–1776.
- **Esawy, M.A., Helmy, W.A., Ahmed, S.A. and Combet, Y., (2007).** Natural Material Role in Production, Activation and Stabilization of Alkaline Protease Produced from a New Isolated *Geobacillus caldoxylosilyticus* IRDO. *Journal of Applied Sciences Research*, **3** (10), 1062-1068.

F

- **Fickers, P., Destain, J. and Thonart, P., (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12** (2), 119-130.
- **Flärdh, K. and Buttner, M.J., (2009).** *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews, Microbiology*, **7**, 36-49.
- **Fink, J.N., Resnick, A.J. and Salvaggio, J., (1971).** presence of thermophilic actinomycetes in residential heating systems. *Applied Microbiology*, **22** (4), 730-731.

G

- **Gill, P.K., Sharma, A.D., Harchand, R.K. and Singh, P., (2003).** Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. *Bioresource Technology*, **87**, 359–362.
- **Gomes, R.C., Semêdo, L.T.A.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S., Linhares, L.F. and Coelho, R.R.R., (2000).** Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*, **30**, 146–150.
- **Gomes, J. and Steiner, W., (2004).** The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.*, **42** (4), 223–235.
- **Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T. and Chater, K.F., (2003).** PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *PNAS*, **100** (4), 1541–1546.

H

- **Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. and Rainey, F.A., (1997).** Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47** (1), 202–206.
- **He, J., (2005).** Molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster from *Streptomyces thioluteus* HKI-227; new insights into polyketide assembly. Dissertation. zur Erlangung des akademischen Grades doctor. Friedrich-Schiller-Universität Jena. Deutschland.
- **Hooton, T.M. and Levy, S.B., (2001).** Antimicrobial resistance: a plan of action for community practice. *American Family Physician*, **63** (6), 1087-1096.
- **Hopwood, D.A., (2006).** Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annual Review of Genetics*, **40**, 1–23.
- **Hopwood, D.A. and Merrick, M.J., (1977).** Genetics of antibiotic production. *Bacteriological Reviews*, **41** (3), 595-635.
- **Hozzein, W.N., Ali, M.I.A. and Rabie, W., (2008).** A new preferential medium for enumeration and isolation of desert actinomycetes. *World J Microbiol Biotechnol*, **24**, 1547–1552.

I

- **Ilić, S.B., Konstantinović, S.S. and Todorović, Z.B., (2005).** Uv/vis analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology*, **12** (1), 44 – 46.
- **Irwin, J.A. and Baird, A.W., (2004).** Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*, **57** (6), 348 – 354.

J

- **Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K.J. and Li, X., (2007).** Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, **92**, 405–416.
- **Jiang, C-L. and Xu, L-H., (1996).** Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Applied And Environmental Microbiology*, **62** (1), 249–253.

K

- **Kalakoutskii, L.V. and Agre, N.S., (1976).** Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Reviews*, **40** (2), 469-524.

- **Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M. and Shizuri, Y., (2005).** Mechercharmycins A and B, Cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J. Antibiot.* **58** (4), 289–292.
- **Kawamoto, I., Oka, T. and Nara, T., (1981).** Cell Wall Composition of *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis*, and Related Organisms. *Journal of Bacteriology*, **146** (2), 527-534.
- **Kecha, M., (1996).** Isolement et sélection de deux souches de Streptomyces productrices d'antifongiques non polyéniques. Taxonomie, extraction, purification et caractérisation partielle des antibiotiques synthétisés. Thèse de magister. Université de Tizi ouzou. Algérie.
- **Keskar, S.S., Rao, M.B. and Deshpande, V.V., (1992).** Characterization and sequencing of an active-site cysteine-containing peptide from the xylanase of a thermotolerant Streptomyces. *Biochem. J.*, **281**, 601-605.
- **Keulen, G.v., Alderson, J., White, J. and Sawers, R.G., (2005).** Nitrate respiration in the actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Biochemical Society Transactions*, **33**, part 1, 210-212.
- **Khachatourians, G.G., (1998).** Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ* • 3 NOV, **159** (9), 1129-1136.
- **Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A., (2000).** Practical Streptomyces Genetics. Norwich, UK: John Innes Foundation. ISBN 0-7084-0623-8.
- **Kim, T.K., Hewavitharana, A.K., Shaw, P.N. and Fuerst, J.A., (2006).** Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge Actinobacteria by phylogenetic prediction. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (3), 2118–2125.
- **(Kim et al., 2004 (1)). Kim, B-J., Kim, C-J., Chun, J., Koh, Y-H., Lee, S-H., Hyun, J-W., Cha, C-Y. and Kook, Y-H., (2004).** Phylogenetic analysis of the genera Streptomyces and Kitasatospora based on partial RNA polymerase β -subunit gene (rpoB) sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 593–598.
- **Kim, B., Sahin, N., Minnikin, D.E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M. and Goodfellow, M., (1999).** Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* , **49**, 7–17.

- **(Kim et al; 2004 (2)). Kim, S.B., Seong, C.N., Jeon, S.J., Bae, K.S. and Goodfellow, M., (2004).** Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 211–214.
- **Kois, A., świątck, M., Jakimowicz, D. and Zakrzewska- Czerwińska, J., (2009).** SMC protein-dependent chromosome condensation during aerial hyphal development in *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, Jan, **191** (1), 310- 319.
- **Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S. and Chopade, B.A., (2004).** Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. *Current Science*, **86** (4), 593-597.
- **Kumar, K.S., Sahu, M.K. and Kathiresan, K., (2005).** Isolation and characterisation of streptomycetes, producing antibiotic, from a mangrove environment. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc*, **7** (3), 457-464.

L

- **Lacey, J., (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*, **4**, 113–121.
- **Lam, K.S., (2006).** Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* , **9**, 245–251.
- **Lamb, D.C., Skaug, T., Song, Hong-Lin., Jackson, C.J., Podust, L.M., Waterman, M.R., Kell, D.B., Kelly, D.E. and Kelly, S.L., (2002).** The Cytochrome P450 Complement (CYPome) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The Journal of Biological Chemistry*, **277** (27), Issue of July 5, 24000–24005.
- **Leclerc, H., Buttiaux, R., Guillaume, J. et Wattre, P., (1977).** Microbiologie appliquée. Doin éditeurs. Biologie appliquée. Collection publiée sous la direction de Albert Obré et René Buttiaux.
- **Leclerc, H., Meyer, A. et Deiana, J., (1995).** Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Doin éditeurs (2^e tirage). Biosciences et techniques. Collection dirigée par J. Figarella, F. Zonzain.
- **Lee, J.Y., Lee, J.Y., Jung, H.W. and Hwang, B.K., (2005).** *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenoic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 257–262.
- **Lefebvre, O., (2005).** Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. France.

- **Lei, L., Waterman, M.R., Fulco, A.J., Kelly, S.L. and Lamb, D.C., (2004).** Availability of specific reductases controls the temporal activity of the cytochrome P450 complement of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PNAS*, **101** (2), 494-499.
- **Lewis, J.W., Morley, N.J., Drinkall, J., Jamieson, B.J., Wright, R., and Parry, J.D., (2009).** Toxic effects of *Streptomyces griseus* spores and exudate on gill pathology of freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 173–181.
- **Li, X., (1997).** *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a new cellulolytic member of the genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47** (2), 443–445.
- **Lian, W., Jayapal, K.P., Charaniya, S., Mehra, S., Glod, F., Kyung, Yun-Seung., Sherman, D.H. and Hu, Wei-Shou., (2008).** Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BioMed Central Genomics*, **9** (56), 1-14.
- **Lyons, A.J, JR. and Pridham, T.G., (1965).** Colorimetric Determination of Color of Aerial Mycelium of *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, **89** (1), 159-169.

M

- **Macovei, L. and Zurek, L., (2006).** Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (6), 4028–4035.
- **Madduri, K. and Hutchinson, C.R., (1995).** Functional characterization and transcriptional analysis of the *dnrR1* locus, which controls daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Journal of Bacteriology*, **177** (5), 1208–1215.
- **Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M. and Sherman, D.H., (2004).** Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (12), 7520–7529.
- **Mahendra, S. and Alvarez-Cohen, L., (2005).** *Pseudonocardia dioxanivorans* sp. nov., a novel actinomycete that grows on 1,4-dioxane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 593–598.
- **Mahr, K., Wezel, G.P.V., Svensson, C., Kregel, U., Bibb, M.J. and Titgemeyer, F., (2000).** Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large-scale purification and biochemical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 253–261.

- **Mehra, S., Charaniya, S., Takano, E. and Hu, W-S., (2008).** A bistable gene switch for antibiotic biosynthesis: the butyrolactone regulon in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE*, **3**, Issue 7, e2724, 1-12.
- **Mehta, V.J., Thumar, J.T., and Singh, S.P., (2006).** Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource Technology*, **97**, 1650–1654.
- **Metsä-Ketelä, M., Halo, L., Munukka, E., Hakala, J., Mäntsälä, P. and Ylihonko, K., (2002).** Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16s ribosomal DNA genes from various *Streptomyces species*. *Applied And Environmental Microbiology*, **68** (9), 4472–4479.
- **Meyers, P.R., Porter, D.S., Omorogie, C., Pule, J.M. and Kwetane, T., (2003).** *Streptomyces speibonae sp. nov.*, a novel streptomycete with blue substrate mycelium isolated from South African soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 801–805.
- **Miguélez, E.M., Hardisson, C. and Manzanal, M.B., (2000).** Streptomycetes: a new model to study cell death. *Internatl Microbiol*, **3**, 153–158.
- **Miguélez, E.M., Hardisson, C. and Manzanal, M.B., (1999).** Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of Cell Biology*, **145** (3), 515-525.
- **Mincer, T.J., Fenical, W. and Jensen, P.R., (2005).** Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (11), 7019–7028.
- **Mohamed, S.H. and Galal, A.M., (2005).** Identification and antivirale activities of some halotolerant Streptomycetes isolated from Qaroon lake. *International Journal of Agriculture & Biology*, **7** (5), 747-753.
- **Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S. and Bogatzevska, N., (2002).** Characteristics of soil actinomycetes from antarctica. *Journal of Culture Collections*, **3**, 3-14.
- **Montalvo, N.F., Mohamed, N.M., Enticknap, J.J. and Hill, R.T., (2005).** Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**, 29–36.
- **Moran, M.A., Rutherford, L.T. and Hodson, R.E., (1995).** Evidence for Indigenous *Streptomyces* Populations in a marine environment determined with a 16s rRNA probe. *Applied And Environmental Microbiology*, **61** (10), 3695–3700.

N

- **Narayana, K.J.P., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y. and Krishna, P.S.J., (2007).** Biological activity of phenylpropionic acid isolated from a terrestrial streptomycetes. *Polish Journal of Microbiology*, **56** (3), 191-197.
- **Nel, S., (2001).** Cloning of the XynA gene from *Thermomyces lanuginosus* and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Magister Scientiae. University of the Free State Bloemfontein. South Africa.
- **Norrby, SR., (1995).** Emerging antibiotic resistance in gram positive bacteria: return to the pre-antibiotic era? *HKMJ*, **1** (2), 129-135.
- **Nouasri, A., (1996).** Les genres *Microellobosporia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (Actinomycétales) dans les sols sahariens : taxonomie numérique ; production, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. Thèse de magister. Ecole Normale Supérieure de Kouba. Algérie.
- **Nouredine née 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 de Tizi ouzou. Algérie.

O

- **Ochi, K., (1995).** A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by Analysis of Ribosomal Protein AT-L30. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, **45** (3), 507–514.
- **Ochi, K., (1987).** Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the Stringent Response (ppGpp) and GTP content in relation to A Factor. *Journal of Bacteriology*, **169** (8), 3608-3616.
- **Oskay, M., Tamer, A.Ü. and Azeri, C., (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, **3** (9), 441-446.

P

- **Palmano, S., Firrao, G. and Locci, R., (2000).** Sequence analysis of domains III and IV of the 23S rRNA gene of verticillate streptomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 1187–1191.
- **Patke, D. and Dey, S., (1998).** Proteolytic activity from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SDP4. *Letters in Applied Microbiology*, **26**, 171-174.
- **Pelczar, M.J, JR., Chan, E.C.S., Krieg, N.R. and Pelczar, M.F., (1986).** Microbiology. McGraw-Hill, Inc. (Fifth edition).

- **Petrosyan, P., García-Varela, M., Luz-Madriral, A., Huitrón, Carlos. and Flores, M.E., (2003).** *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , **53**, 269–273.
- **Pieri, F. et Kirkiacharian, S., (1992).** Pharmacologie et thérapeutique. Edition marketing (2è édition).
- **Pimentel-Schmitt, E.F., (2006).** Carbon metabolism in actinomycetes. A molecular view to glucose-related phenomena. Den naturwissenschaftlichen Fakultäten der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Erlangung des Doktorgrades. Deutschland.
- **Pizzul, L., (2006).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by actinomycetes. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- **Plou, F.J., Ferrer, M., Nuero, O.M., Calvo, M.V., Alcalde, M., Reyes, F. and Ballesteros, A., (1998).** Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology Techniques*, **12** (3), 183–186.

R

- **Rahman, O., Pfitzcnmaicr, M., Pester, O., Morath, S., Cummings, S.P., Hartung, T. and Sutcliffe, I.C., (2009).** Macroamphiphilic components of thermophilic actinomycetes: identification of lipoteichoic acid in *Thermobifida fusca*. *Journal of Bacteriology*, **191** (1), 152–160.
- **Ramesh, S., Jayaprakashvel, M. and Mathivanan, N., (2006).** Microbial status in seawater and coastal sediments during pre- and post-tsunami periods in the Bay of Bengal, India. *Marine Ecology*, **27**, 198–203.
- **Rifaat, H.M., (2003).** The biodiversity of actinomycetes in the river Nile exhibiting antifungal activity. *Journal of Mediterranean Ecology*, **4** (3-4), 5-7.
- **Rifaat, H.M., El-Said, O.H., Hassanein, S.M. and Selim, M.S.M., (2007).** Protease activity of some mesophilic streptomyces isolated from Egyptian habitats. *Journal of Culture Collections*, **5**, 16-24.
- **Rifaat, H.M., Nagieb, Z.A. and Ahmed, Y.M., (2005).** Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp. *Applied Ecology and Environmental Research* **4** (1), 151-160.
- **Rintala, H., (2003).** Streptomyces in indoor environments –PCR based detection and diversity. Academic dissertation. Laboratory of environmental microbiology at the National Public Health Institute, Kuopio, and university of Kuopio, Finland.

- **Rodríguez-García, A., Combes, P., Pérez-Redondo, R., Smith, M.C.A. and Smith, M.C.M., (2005).** Natural and synthetic tetracycline-inducible promoters for use in the antibiotic-producing bacteria *Streptomyces*. *Nucleic Acids Research*, **33** (9), e87, 1-8.
- **Roy, S., Khasa, D.P. and Greer, C.W., (2007).** Combining alders, frankiae, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. *Can. J. Bot.*, **85**, 237-251.
- **Russell, A.D., (2002).** Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduction. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* , **92**, 1S–3S.

S

- **Sabaou, N., (1988).** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies Algériennes: systématique et ecologie. Thèse de doctorat. Université des sciences et de la technologie, Alger, Algerie.
- **Sahin, N., (2005).** Antimicrobial activity of *Streptomyces* species against mushroom blotch disease pathogen. *J. Basic Microbiol*, **45** (1), 64–71.
- **San Paolo, S., (2007).** Characterization of regulatory pathways controlling morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. Inauguraldissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel. Schweiz.
- **Schaeren, W., (2006).** Antibiotiques utilisés en production laitière en 2003-2004. *Revue suisse Agric*, **38** (4), 215-220.
- **Seong, C.N., Choi, J.H. and Baik, K-S., (2001).** An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. *The Journal of Microbiology*, **39** (1), 17-23.
- **Shatta, A.M., El-Hamahmy, A.F., Ahmed, F.H., Ibrahim, M.M.K. and Arafa, M.A.I., (1990).** The influence of certain nutritional and environmental factors on the production of amylase enzyme by *Streptomyces aureofaciens* 77. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, **3** (2), 134–138.
- **Sholeva, Z. and Ivanova, I., (1995).** Changes in *Streptomyces hygroscopicus* 155 endopeptidase and aminopeptidase activity and heat resistance under starvation and increased temperature. *Journal of Culture Collections*, **1**, 11-17.
- **Simkhada, J.R., Lee, H.J., Jang, S.Y., Kim, J.H., Lee, H.C., Sohng, J.K. and Yoo, J.C., (2009).** A novel low molecular weight phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS684. *Bioresource Technology*, **100**, 1388–1393.
- **Soares, A.C.F., Sousa, C.d.S., Garrido, M.d.S., Perez, J.O. and de Almeida, N.S., (2006).** Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens

Curvularia Eragrostides and *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **37**, 456-461.

- **Sripairoj, P., Tanasupawat, S. and Suwanborirux, K., (2008)**. 16S rDNA sequence analyses and antimicrobial activities of *Streptomyces* strains from Thai soils. *J Health Res*, **22** (1), 1-8.
- **Srivibool, R. and Sukchotiratana, M., (2006)**. Bioprospective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, **28** (3), 493-499.
- **Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L., (1997)**. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47** (2), 479-491.
- **Staneck, J.L. and Roberts, G.D., (1974)**. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. *Applied Microbiology*, **28** (2), 226-231.
- **Stutzenberger, F.J., (1987)**. Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. *Journal of Bacteriology*, **169** (6), 2774-2780.
- **Suzuki, S-I., Okuda, T. and Komatsubara, S., (1999)**. Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (5), 1930–1935.

T

- **Tan, H.M., Cao, L.X., He, Z.F., Su, G.J., Lin, B. and Zhou, S.N., (2006)**. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro. *World J Microbiol Biotechnol*, **22**, 1275–1280.
- **Terki, M., (2006)**. Les antibiotiques. In : Microbiologie. S₁ clinique. F. Boulahbal. Office des publications universitaires. 5^{ème} édition. P127.
- **Theilleux, J., (1993)**. Les actinomycètes. In : Microbiologie Industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Coordonnateurs J. –Y. Leveau, M. Bouix. Technique et documentation – Lavoisier, Paris.424-480. Collection Sciences et Techniques. Agro-Alimentaires. Président du directoire : J.L. Multon.
- **Tisdall, P.A. and Anhalt, J.P., (1979)**. Rapid differentiation of *Streptomyces* from *Nocardia* by liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, **10** (4), 503-505.
- **Tremblay, D., Lemay, J., Gilbert, M., Chapdelaine, Y., Dupont, C. and Morosoli, R., (2002)**. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces*

lividans of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Can. J. Microbiol*, **48**, 43–48.

- **Tuncer, M., (2000).** Characterization of endoxylanase activity from *Thermomonospora Fusca* BD25. *Turk J Biol*, **24**, 737–752.

V

- **Valderrama, M.J., Monteoliva-Sanchez, M., Quesada, E. and Ramos-Cormenzana, A. (1998).** Influence of salt concentration on the cellular fatty acid composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Res. Microbiol.*, **149**, 675-679.
- **Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Déry, C., Brzezinski, R. and Beaulieu, C., (1996).** Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (5), 1630–1635.
- **Vasavada, S.H., Thumar, J.T. and Singh, S.P., (2006).** Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science*, **91** (10), 1393-1397.
- **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. *African Journal of Biotechnology*, **7** (18), 3225-3230.

W

- **Wagman, G.H., Gannon, R.D. and Weinstein, M.J., (1969).** Production of vitamin B₁₂ by *Micromonospora*. *Applied Microbiology*, **17** (4), 648-649.
- **Wu, X-C., Chen, W-F., Qian, C-D., Li, O., Li, P. and Wen, Y-P., (2007).** Isolation and Identification of Newly Isolated Antagonistic *Streptomyces* sp. Strain AP19-2 Producing Chromomycins. *The Journal of Microbiology*, **45** (6), 499-504.

Y

- **Yamac, M. and Tamer, A.U., (2008).** Degradation and Acid Precipitable Polymeric Lignin (Appl) Accumulation by Selected *Streptomyces* Strains in Submerged and Solid State Culture Systems. *Journal of Applied Biological Sciences*, **2** (2), 55-61.
- **Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H-o., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T. and Ueda, K., (2005).** Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology*, **151**, 2899–2905.

- **Yilmaz, E.I., Yavuz, M. and Kizil, M., (2008).** Molecular characterization of rhizospheric soil streptomycetes isolated from indigenous Turkish plants and their antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol*, **24**, 1461–1470.

Z

- **Zarandi, M.E., Bonjar, G.H.S., Dehkaei, F.P., Moosavi, S.A.A., Farokhi, P.R. and Aghighi, S., (2009).** Biological control of rice blast (*magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. *American Journal of Applied Sciences*, **6** (1), 194-199.
- **Zenova, G.M., Gryadunova, A.A., Doroshenko, E.A., Likhacheva, A.A., Sudnitsyn, I.I., Pochatkova, T.N. and Zvyagintsev, D.G., (2007).** Influence of Moisture on the Vital Activity of Actinomycetes in a Cultivated Low-Moor Peat Soil. *Eurasian Soil Science*, **40** (5), 560–564.
- **Zerizer, H., Oulmi, L., Boughachiche, F., Reghioua, S., Boudemagh, A., Kitouni, M. et Boulahrouf, A., (2006).** Identification d'une actinomycetale, productrice d'antibactériens, isolée de sols arides de la région de biskra. *Sciences & Technologie C* (24), 17-22.
- **Zhang, D-Q., He, P-J., Yu, L-Z. and Shao, L-M., (2009).** Effect of inoculation time on the bio-drying performance of combined hydrolytic–aerobic process. *Bioresource Technology*, **100**, 1087–1093.
- **Zhao, H., Kassama, Y., Young, M., Kell, D.B. and Goodacre, R., (2004).** Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the Amplified Fragment Length Polymorphism Technique. *Applied And Environmental Microbiology*, **70** (11), 6619–6627.
- **Zhi, X-Y., Tang, S-K., Li, W-J., Xu, L-H. and Jiang, C-L., (2006).** New genus-specific primers for the PCR identification of novel isolates of the genus *Streptomonospora*. *FEMS Microbiol Lett*, **263**, 48–53.
- **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 de Tizi Ouzou. Algérie.
- **Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A., (2004).** Mutactimycin PR, a new Anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, **57** (6), 367 — 372.

Anonyme 1

<http://bac.hs.med.kyoto-u.ac.jp/Domain-e/Bacteria/14Actinobacteria/01Actinobacteria/05Actinobacteridae/01Actinomycetales/07Streptomycineae/01Streptomyetaceae/index.html>

Anonyme 2

http://fr.wikipedia.org/wiki/Recherche_de_la_nitrate_r%C3%A9ductase

Annexes

Annexe I

Milieux de culture

Milieu Nitrate Amidon avec 10% de NaCl

Contenu par litre : amidon 20.0 g ; K_2HPO_4 : 1.0 g ; KNO_3 : 2.0 g ; $MgSO_4, 7H_2O$: 0.5 g ; $CaCO_3$: 3.0 g ; solution d'élément trace : 1 ml ; NaCl : 10%.

* Solution d'élément trace : 0.1 g par litre de chacun des éléments suivant : $FeSO_4, 7H_2O$; $MnCl_2, 4H_2O$ et $ZnSO_4, 7H_2O$ (Al-zarban et al., 2002).

Milieu M2

Agar (18 g/l) ; amidon (10 g/l) ; KNO_3 (2 g/l) ; K_2HPO_4 (2 g/l) ; NaCl (2 g/l) ; caséine (0,3 g/l) ; $MgSO_4.7H_2O$ (0,05g/l) ; $CaCo_3$ (0,02g/l) ; $FeSO_4.7H_2O$ (0,01 g/l) (Boughachiche et al., 2005).

Milieu ISP 1

Tryptone : 5 g ; extrait de levure : 3 g ; agar : 15 g ; eau distillée q.s.p.:1000 ml. pH = 7,2

Milieu ISP 2

Extrait de levure : 4 g ; extrait de malt : 10 g ; glucose : 4 g ; eau distillée q.s.p.:1000 ml ; agar : 20 g. pH = 7,2

Milieu ISP 4

Amidon : 10 g ; K_2HPO_4 : 1 g ; $MgSO_4, 7H_2O$: 1 g ; NaCl : 1 g ; $(NH_4)_2SO_4$: 2 g ; $CaCO_3$: 2 g ; solution saline standard : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p.:1000 ml. pH = 7,2

* Solution saline standard : $FeSO_4, 7H_2O$: 0,1 g ; $MnCl_2, 4H_2O$: 0,1 g ; $ZnSO_4, 7H_2O$: 0,1 g ; eau distillée q.s.p.:100 ml

Milieu ISP 5

Glycérol : 10 g ; L.asparagine : 1 g ; K_2HPO_4 : 1 g ; solution saline standard (voir ISP 4) : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p.:1000 ml ; pH = 7,2

Milieu Bennett.

Glucose : 10 g ; peptone : 2 g ; extrait de levure : 1 g ; agar : 18 g ; eau distillée q.s.p.:1000 ml. pH :7,2

Milieu GYEA

Extrait de levure : 10 g ; glucose : 10 g ; agar : 18 g ; eau distillée : 1000 ml ; pH = 6,8

Milieu ISP 7

Glycérol : 15 g ; L-tyrosine : 0,5 g ; L-asparagine : 1 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; $MgSO_4, 7H_2O$: 0,5 g ; NaCl : 0,5 g ; $FeSO_4, 7H_2O$: 0,01 g ; solution saline standard (voir ISP 4) : 1 ml ; agar : 18 g ; eau distillée q.s.p.:1000 ml. pH = 7,2

Production de nitrate réductase

Peptone : 1 g ; extrait de viande : 1 g ; extrait de levure : 2 g ; KNO_3 : 1 g ; eau distillée q.s.p.:1000 ml. pH = 7,5

Dégradation du tween 80

Composition : $NaNO_3$: 1 g ; extrait de levure : 5 g ; solution saline : 50 ml ; $CaCl_2, 2H_2O$: 0,1 g ; tween 80 : 10 ml ; eau distillée q.s.p.:1000 ml ; agar : 18 g. pH = 7,2.

* Solution saline : K_2HPO_4 : 0,25 g ; $MgSO_4, 7H_2O$: 0,125 g ; NaCl : 0,125 g ; $FeSO_4, 7H_2O$: 0,001 g ; $MnSO_4$: 0,001 g, eau distillée : 50 ml.

* La dégradation du tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies

Dégradation des sels de sodium

Composition : sel de sodium : 2 g ; NaCl : 2 g ; $MgSO_4, 7H_2O$: 0,2 g ; $(NH_4)_2HPO_4$: 1 g ; KH_2PO_4 : 0,5 g ; agar : 15 g ; eau distillée : 1000 ml ; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04 % : 20 ml ; pH = 6,8.

La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose

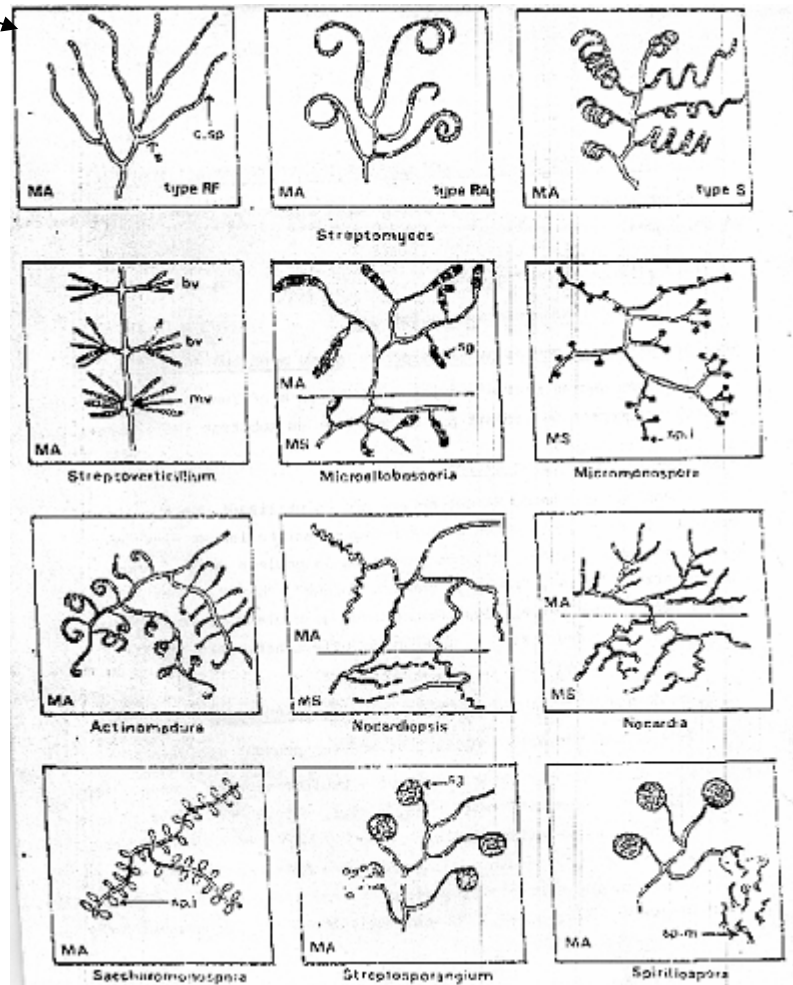
Milieu ISP 9

$(NH_4)_2SO_4$: 2,64 g ; KH_2PO_4 : 2,38 g ; K_2HPO_4 : 5,65 g ; $MgSO_4, 7H_2O$: 1 g ; solution saline* : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée : 1000 ml ; pH = 6,8-7.

* Solution saline : $CuSO_4, 5H_2O$: 0,64 g ; $FeSO_4, 7H_2O$: 0,11 g ; $MnCl_2, 4H_2O$: 0,79 g ; $ZnSO_4, 7H_2O$: 0,15 g ; eau distillée : 1000 ml

Annexe II Images

Streptomyces
Type : RF



Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes

Types : RF = Rectus Flexibilis, RA = Retinaculum Apertum, S = Spira.

MA = mycélium aérien. MS = mycélium du substrat. bv = biverticillé. mv = monoverticillé.

s = sporophore. c.sp = chaîne de spores. Sp.i = spores isolées. sp.m = spores mobiles.

sg. = sporangie (**Sabaou, 1988**).

Annexe III

Tableau 4. Pigmentation des souches isolées sur différents milieux

Milieu	Isolat	MA	MS
GYEA à 7,5g/l de NaCl	B	Blanc	Orange vif
	S25	Blanc	Orange brunâtre
	OG	Blanc	Blanc
	S15	Blanc	Orange brunâtre
	R	Blanc	blanc
ISP5 à 0% de NaCl	B	Blanc	Orange vif
	S25	Blanc	Rose vif
	OG	Blanc	Blanc
	S15	Brun foncé	Brun foncé
	R	Blanc	Blanc
ISP4 à 0% de NaCl	B	Blanc	Orange vif
	S25	Blanc	Rose vif
	OG	Blanc	Jaune vif
	S15	Blanc	Blanc
	R	Blanc	Brun foncé
Benett à 0% de NaCl	B	Blanc	Orange vif
	S25	Blanc	Brun foncé
	OG	Blanc	Jaune vif
	S15	Blanc	Brun foncé
	R	Blanc	Rouge vif
ISP2 à 0% de NaCl	B	Blanc	Brun foncé
	S25	Blanc	Brun foncé
	OG	Blanc	Jaune vif
	S15	Blanc	Brun foncé
	R	Blanc	Brun foncé
ISP7 à 0% de NaCl	B	Blanc	Blanc
	S25	Brun foncé	Brun foncé
	OG	Blanc	Blanc
	S15	Brun foncé	Brun foncé
	R	Blanc	Blanc

Annexe IV
Matériel utilisé

- Agitateur
- Bain marie
- Balance électronique
- Centrifugeuse
- Etuve
- Four pasteur
- Loupe binoculaire
- Microscope optique
- Plaque avec agitation
- ph-mètre
- Rota vapor

Abstract

The increase of microbial resistance to antibiotics and the slowing pace at which new antibiotics are being produced justify the urgent need to discover new antimicrobial molecules.

This work is devoted to the study of microorganisms famous for antibiotics production : the actinomycetes. However, this gigantic bacterial group is widely exploited. In order to increase the probability of avoiding the possibility of studying an actinomycetes already examined, this study is focused on halotolerant actinomycetes.

Bacterial colonies similar to actinomycetes by their macroscopic aspect were isolated. The microscopic observation revealed that these colonies are Gram positive bacteria with a filamentous aspect, which makes them close to the actinomycetes.

The actinomycetes selected on the basis of their antimicrobial activity have been the subject of a morphological study. The latter showed that the color of the vegetative and aerial mycelia of the studied actinomycetes varied depending on the medium composition and the age of the culture.

These actinomycetes were subsequently tested to assess their possible ability to hydrolyse some compounds. This physiological study showed that one strain of the studied actinomycetes could be interesting in microbial technology as it has probably produced a tyrosinase, a caseinase and a lipase. Given that growth at 45°C and 50°C was only observed with this actinomycetes.

The antimicrobial activity was shown by three techniques : well diffusion, agar blocks, cross streak methods. One strain of the studied actinomycetes showed an interesting activity against *Aspergillus niger*. It was then the subject of a chemotaxonomic study.

The latter revealed that this actinomycetes contains the LL isomer of DAP and glycine and is characterized by the absence of characteristic sugars. Suggesting that it is a Streptomyces.

Keywords : actinomycetes, halotolerant, selection, antimicrobial substances.

ملخص

تزايد مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية و تباطؤ وتيرة إنتاج مضادات حيوية جديدة يبرران الحاجة الملحة لجزئيات جديدة من مضادات الميكروبات. هذا العمل مكرس لدراسة كائنات حية مجهرية معروفة بإنتاج مضادات حيوية: الاكتينوميستات. بيد أن هذه المجموعة الضخمة البكتيرية مستغلة على نطاق واسع. لزيادة احتمال تجنب إمكانية دراسة اكتينوميستات مستغل من قبل، تركز هذه الدراسة على الاكتينوميستات القادرة على تحمل درجات ملوحة عالية نسبيا.

مستعمرات بكتيرية متشابهة بمظهرها بالعين المجردة مع الاكتينوميستات قد تم عزلها. الملاحظة المجهرية بينت أن هذه المستعمرات تمثل بكتيريا موجبة الغرام ذات مظهر خيطي، مما يقرب هذه المستعمرات من الاكتينوميستات.

الاكتينوميستات الذين تم اختيارهم على أساس نشاطهم المضاد للميكروبات كانوا موضع دراسة مورفولوجية. هذه الدراسة أظهرت أن لون المستعمرات مرتبط بمكونات الوسط و بعمر المستعمرات.

الاكتينوميستات المختارون كانوا بعد ذلك موضع تجارب لتقييم قدرتهم على تحليل بعض المركبات. هذه الدراسة الفيزيولوجية أظهرت بان احد الاكتينوميستات الذين درسوا بإمكانه أن يكون ذا قيمة معتبرة في مجال التكنولوجيا الميكروبية لأنه أنتج أنزيم التيروسيناز، أنزيم الكازيبيناز، و أنزيم الليباز. نظرا إلى أن النمو عند 45 و 50 درجة مئوية لم يلاحظ إلا مع هذا الاكتينوميستات.

القدرة المضادة للميكروبات قد أبرزت بثلاث تقنيات: تقنية الآبار، تقنية اسطوانات الاقار، و تقنية الخطوط العمودية على الخط الممثل للاكتينوميستات المحرب. احد الاكتينوميستات الذين درسوا أظهر قدرة معتبرة ضد اسبارجيلوس نيثار. لذا فقد كان موضع دراسة كيميائية من اجل تصنيفه.

هذه الدراسة الكيميائية أظهرت أن هذا الاكتينوميستات يملك النظر ل لحمض DAP و الفلايسين و يتميز بعدم وجود سكريات مميزة. مما يشير إلى أنه سترينوميستات.

الكلمات الرئيسية: الاكتينوميستات، تحمل درجات ملوحة عالية نسبيا، اختيار، مواد مضادة للميكروبات.

Résumé

La hausse de la résistance microbienne aux antibiotiques et le ralentissement du rythme avec lequel de nouveaux antibiotiques sont entrain d'être produits justifient l'urgence de disposer de nouvelles molécules antimicrobiennes.

Ce travail est consacré à l'étude de microorganismes réputés pour la production d'antibiotiques : les actinomycètes. Cependant, ce gigantesque groupe bactérien est largement exploité. Pour augmenter la probabilité d'éviter l'éventualité d'étudier un actinomycète déjà examiné, cette étude s'intéresse particulièrement aux actinomycètes halotolérants.

Des colonies bactériennes assimilables par leur aspect macroscopique aux actinomycètes ont été prélevées. L'observation microscopique a révélé que ces colonies sont des bactéries Gram positives avec un aspect filamenteux, ce qui les rapproche des actinomycètes.

Les actinomycètes sélectionnés sur la base de leur activité antimicrobienne ont fait l'objet d'une étude morphologique. Cette dernière a montré que la couleur des mycéliums végétatif et aérien des actinomycètes étudiés a varié selon la composition du milieu et l'âge de la culture.

Ces actinomycètes ont par la suite été testés pour évaluer leur éventuelle capacité d'hydrolyser certains composés. Cette étude physiologique a montré que l'une des souches d'actinomycètes étudiées pourrait être intéressante en technologie microbienne étant donné qu'elle a probablement produit une tyrosinase, une caséinase, et une lipase. Vu que, la croissance à 45°C et à 50°C n'a été observée qu'avec cet actinomycète.

L'activité antibactérienne a été mise en évidence par trois techniques : technique des puits, des cylindres d'agar et celle des stries croisées. L'une des souches d'actinomycètes étudiées a montré une activité intéressante vis-à-vis d'*Aspergillus Niger*. Elle a fait alors l'objet d'une étude chimiotaxonomique.

Cette dernière a révélé que cet actinomycète contient l'isomère LL du DAP et de la glycine et qu'il est caractérisé par l'absence de sucres caractéristiques. Ce qui suggère que c'est un *Streptomyces*.

Mots clés : *actinomycètes, halotolérants, sélection, substances antimicrobiennes.*