

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

MEMOIRE
De Magister en Microbiologie Appliquée

**Etude taxonomique de souches
d'actinomycètes halophiles modérées
productrices de substances antimicrobiennes
isolées dans la région de Béjaia**

Par DJINNI Ibtissem

Soutenue ledevant le jury composé de :

M ^r BENALLAOUA. S	Professeur	Président
M ^r KECHA. M	Maitre de conférences A	Rapporteur
M ^{me} BEDJOU. F	Maitre de conférences A	Examinatrice
M ^r TOUATI. A	Maitre de conférences A	Examineur
M ^{elle} KHETTAL. B	Maitre de conférences B	Invitée

2008-2009

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

MEMOIRE
De Magister en Microbiologie Appliquée

**Etude taxonomique de souches
d'actinomycètes halophiles modérées
productrices de substances antimicrobiennes
isolées dans la région de Béjaia**

Par DJINNI Ibtissem

Soutenue ledevant le jury composé de :

M ^r BENALLAOUA. S	Professeur	Président
M ^r KECHA. M	Maitre de conférences A	Rapporteur
M ^{me} BEDJOU. F	Maitre de conférences A	Examinatrice
M ^r TOUATI. A	Maitre de conférences A	Examineur
M ^{elle} KHETTAL. B	Maitre de conférences B	Invitée

2008-2009

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui m'ont appris une infinité de choses et qui m'ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions.

En premier lieu, j'adresse mes vifs remerciements au Professeur Benallaoua. S, directeur du Laboratoire de Biochimie Microbienne pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail ; mais également pour avoir bien voulu examiner ce mémoire et m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il reçoive l'expression de ma vive gratitude.

J'exprime mes vifs remerciements au Docteur Kecha. M, qui a bien voulu superviser ce travail mais surtout pour la liberté qu'il m'a accordé tant dans le choix du sujet que dans la prise d'initiatives. Je ne saurai le remercier assez pour son soutien et son suivi scientifique le long de la réalisation de ce travail. Je lui dois beaucoup pour la confiance qu'il m'a témoigné et pour les encouragements et les conseils qu'il m'a prodigué.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer, également, mes remerciements à :

M^{me} Bedjou. F, Maître de Conférences à l'Université de Béjaia qui a bien voulu examiner ce travail et faire partie du jury.

M^{elle} Khettal. B, Maître de Conférences à l'Université de Béjaia qui a bien voulu apporter une appréciation à ce mémoire et être parmi les membres de jury.

Qu'elles trouvent ici l'assurance de toute ma gratitude.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude au professeur Sabaou. N de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (ENS) pour toute l'aide qu'il m'a apporté mais aussi pour sa disponibilité et son écoute. Il m'est agréable de lui exprimer ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Je souligne ma reconnaissance aux membres du laboratoire de Biochimie Microbienne, notamment M^{me} Keramane, D^r Touati, M^{me} et M^r Nabti, M^{me} Gharout M^{elle} Bouktit et M^{elle} Belhamiche. Aussi à M^r Belhadi et M^r Ramdani, pour leur gentillesse, leur aide, leurs précieux conseils et leur disponibilité.

Un immense merci également aux techniciens dont je citerai, M^{elle} Ouatah Amel, M^{me} Iouknane Karima, M^r Amrouche, M^{me} Kharbachi et M^{me} Ramdani sans oublier M^{me} Belkacemi du département de Génie des procédés; mais aussi à tous ceux que je ne peux pas tous citer qui à un moment ou un autre, m'ont prodigué des conseils scientifiques, fourni une aide matérielle et technique, ou tout simplement humaine.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A la mémoire de ma très chère mère, à qui je dois tout, tant le souvenir de ses conseils, de son soutien dans les moments importants de ma vie et de ses encouragements m'ont permis d'aller de l'avant et d'atteindre les objectifs qu'on s'est fixé ensemble. Aucun hommage ni remerciement ne saurait être suffisant.

*J*e remercie également toute ma famille pour son soutien et son affection au cours de mes études... Je citerai en particulier mon père, pour son soutien inconditionnel, pour sa confiance permanente et l'acceptation de mes choix parfois ambitieux.

Il a toujours fait preuve de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions. Merci pour tout et merci pour m'avoir montré la voie des Sciences de la vie.

A mes frères et à ma sœur pour avoir cru en moi et auxquels je souhaite beaucoup de réussite.

*J*e ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chères amies et collègues, Samiha, avec qui j'ai partagé des moments forts, Betitra (Betty), Fahima et Badria pour l'ambiance cordiale et l'aide qu'elles m'ont apporté à tout moment. Je leur souhaite, à toutes, bonne continuation et beaucoup de réussite.

« Quel que soit le critère auquel on se réfère, les bactéries furent dès le début, sont aujourd'hui et resteront les organismes les plus réussis de la Terre »

S.J. Gould (1977), " L'éventail du vivant", Ed. du Seuil, ISBN 2-02-04093, p55

GLOSSAIRE

- **Alvéolite Allergique Extrinsèque (AAE)** : est une inflammation pulmonaire pouvant être causée par 4 actinomycètes thermophiles : *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Saccharomonospora viridis*, *Thermoactinomyces sacchari* et *T. vulgaris* (**Harvey, 1999**).
- **Chimiotropisme** : Effet d'attraction ou de répulsion exercé par certaines substances sur une cellule vivante capable de nager ou de ramper pour se rapprocher ou s'éloigner du point d'où diffuse cette substance. Le chimiotropisme est un déplacement d'un organe ou d'une cellule, orienté par un gradient de concentration chimique (**Larousse Encyclopédie, 2008**).
- **Idiophase** : Période de la culture microbienne durant laquelle des métabolites secondaires sont produits (**Larpent, 1989**).
- **Ramification dichotomique** : La ramification dichotomique résulte de la division en deux parties égales de la zone apicale. Le résultat est la réalisation d'un appareil végétatif régulièrement bifurqué (**Grigoriu, 1986 et Boullard, 1999**).
- **Ramification monopodiale** : Dans la ramification monopodiale un axe principal, à croissance continue, porte des axes secondaires. (**Grigoriu, 1986 et Boullard, 1999**).
- **Sclérotés** : Ils se présentent sous la forme de masses mycéliennes compactes, souvent très dures, globuleuses, ellipsoïdales ou allongées. Ils sont considérés comme des organes de conservation (**Theileux, 1993**).
- **Siderophores** : Les siderophores sont de petites molécules diffusibles sécrétées par de nombreux microorganismes formant des complexes très stables avec des ions ferriques, connues pour présenter une activité antibiotique (**Wang et al., 1999**).
- **Synnemata** : Appelées également corémies, sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Les synnema ou coremie définissent aussi des colonnes d'hyphes stériles. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema* (**Theileux, 1993**).
- **Trophophase** : Période de la culture microbienne caractérisée par une croissance cellulaire active et la production de métabolites primaires (**Larpent, 1989**).
- **Zwitterions** : Un zwitterion est une espèce chimique possédant des charges électriques formelles d'une unité de signes opposés. Ces espèces possèdent en même temps des charges positives et négatives (**Larousse Encyclopédie, 2008**).

LISTE DES ABREVIATIONS

AAE : Alvéolite Allergique Extrinsèque	NRRL : Northern Regional Research Center, USA
A.E : Acétate d'éthyle	OMS : Organisation mondiale de la santé
A.M : Acétate d'éthyle – Méthanol	PC : phosphatidylcholine
AN.E : Acétonitrile –eau	PE : phosphatidylétanolamine
ATCC : American type culture collection	P 10 : Pénicilline
B 10 : Bacitracine	q.s.p : Quantité suffisante pour
B. subtilis : <i>Bacillus subtilis</i>	ral : Ralentissement
B.A.E : <i>n</i> -butanol-acide acétique-eau	Rf : Rapport frontal
Benz : Benzène	RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
But : <i>n</i> -butanol	SP 100 : Spiramicine
CCM : Chromatographie sur couche mince	T 30 : Oxytetracycline
C.E : Conductivité électrique	TE 30 : Tétracycline
DAP : diaminopimélique acid	TOB 10 : Tobramycine
DM : Dichlorométhane	UFC/gss : unités formant colonies par gramme de sol sec
E 15 : Erythromycine	UAMB : Université Abderrahmane Mira de Bejaia
E.A.E : Ethanol-ammoniaque-eau	USDA : United States of Department of Agriculture
E.coli : <i>Escherichia coli</i>	UV-VIS : Ultraviolet-Visible.
E.N.S : Ecole Normale Supérieure	Va 30 : Vancomycine.
Fus. Polyferatum : <i>Fusarium polyferatum</i>	
G+C : Guanine +cytosine	
Gr : Grossissement	
GYEA : Glucose-Yeast-Extract-Agar (milieu de culture)	
Hex : <i>n</i> -hexane	
HPLC : Hight Performance Liquid Chromatography	
IR : Infrarouge	
ISP : International <i>Streptomyces</i> Project (milieu de culture)	
K.pneumoniae : <i>Klebsiella. Pneumoniae</i>	
LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée	
MA : Mycélium aérien	
MIB : 2- méthylisoborneol	
MS : Mycélium du substrat	
MWM : Milieu Williams Modifié (milieu de culture)	
NAR : Nalidixic acid resistant	
ND : Non déterminé	

Liste des figures

Figure 1 : Enrichissement des actinomycètes mobiles à partir des échantillons de sol	8
Figure 2 : Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes non mobiles monosporulés.....	12
Figure 3 : Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes non mobiles dotés d'oligospores	12
Figure 4 : Photographies au microscope électronique d'un isolat d'actinomycète non mobile à sporanges	13
Figure 5 : Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes mobiles à Sporanges	13
Figure 6 : Aperçu des différents habitats des organismes halophiles.....	23
Figure 7 : Représentation schématique de l'effet des solutés compatibles sur la conformation et la stabilité d'une protéine	30
Figure 8 : Cycle de différenciation chez le genre <i>Streptomyces</i>	31
Figure 9 : Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes	34
Figure 10 : Exemples de composés bioactifs produits par des actinomycètes halophiles	38
Figure 11 : Section verticale d'une colonie de <i>Streptomyces</i>	41
Figure 12 : Source d'eau salée : Iadnannen.....	43
Figure 13 : Cristaux de sel à la surface du sol au voisinage de la source	43
Figure 14 : Vue d'ensemble du site de prélèvement : Iadnannen (commune de Feraoun)	43
Figure 15 : Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu Williams modifié solide par la méthode des stries croisées	46
Figure 16 : Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes sur milieu Muller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar.....	48
Figure 17 : Chromatographie ascendante	51
Figure 18 : Chromatographie descendante à front perdu	51
Figure 19 : Protocole d'extraction des antibiotiques à partir des mycéliums et des filtrats de cultures.	56
Figure 20 : Sélection du solvant d'extraction après antibiographie : (méthode des puits)	57
Figure 21 : Chambre de visualisation UV	58
Figure 22 : Courbe d'étalonnage du carbonate total (Annexe 4)	VI
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la conductivité (Annexe 4)	VI
Figure 24 : Classe de salinité en fonction de la conductivité électrique (Riverside USA) (Annexe 4)	VI
Figure 25 : Activité antagoniste des souches testées (S_6 , S_9 , S_{17} et S_{29}) par la méthode des stries croisées.	64
Figure 26 : Activité antagoniste des souches testées mises en évidence par la méthode des cylindres d'agar.....	67
Figure 27 : Micromorphologie de la souche S_6 cultivée pendant 21 jours à 28°C, vu au microscope optique : des filaments du mycélium aérien (chaines de spores en forme de verticilles). (a) : Gr x100 ; (b) : Gr x400.	73
Figure 28 : Micromorphologie des souches S_9 et S_{17} cultivées pendant 21 jours à 28°C, vu au microscope optique : des filaments du mycélium aérien. Gr x100	74
Figure 29 : Caractérisation des sucres pariétaux pour les isolats S_6 , S_9 , S_{17} et S_{29}	76
Figure 30 : Détermination des acides aminés pariétaux pour les isolats S_6 , S_9 , S_{17} et S_{29}	76
Figure 31 : Courbe de croissance de l'isolat S_6 sur milieu Williams modifié liquide à 28°C et à différentes valeurs de pH	80

Figure 32 : Courbe de croissance de l'isolat S ₉ sur milieu liquide Williams modifié à 28°C et à différentes valeurs de pH	83
Figure 33 : Courbe de croissance de l'isolat S ₁₇ sur milieu liquide Williams modifié à 28°C et à différentes valeurs de pH	83
Figure 34 : Courbe de croissance de l'isolat S ₂₉ sur milieu liquide Williams modifié à 28°C et à différentes valeurs de pH	83
Figure 35 : Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat S ₆ en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de bactéries et champignons cibles.	86
Figure 35 bis : Antibiogramme de la souche S ₆ vis-à-vis de deux germes cibles : <i>M. luteus</i> (35a) et <i>C. albicans</i> (35b).....	87
Figure 36 : Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat S ₉ en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de bactéries et champignons cibles.	87
Figure 36 bis : Antibiogramme de la souche S ₉ vis-à-vis de deux germes cibles : <i>B. subtilis</i> (36a) et <i>Asp. niger</i> (36b).....	88
Figure 37 : Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat S ₁₇ en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de bactéries et champignons cibles.	88
Figure 37 bis : Antibiogramme de la souche S ₁₇ vis-à-vis de <i>C. albicans</i>	88
Figure 38 : Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat S ₂₉ en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de bactéries et champignons cibles.	89
Figure 38 bis : Antibiogramme de la souche S ₂₉ vis-à-vis de deux germes cibles : <i>Asp. niger</i> (38a) et <i>S. aureus</i> (38b)	89
Figure 39 : Chromatographie sur couche mince (CCM) avec différents systèmes d'élution [sous lumière UV à 254 nm] des extraits organiques des isolats S ₆ , S ₉ , S ₁₇ et S ₂₉	92
Figure 40 : Plaque de gel de silice révélée au diphenylamine-aniline à chaud	97
Figure 41 : Plaque de gel de silice révélée à la vanilline -H ₂ SO ₄ à chaud	97
Figure 42 : Spectres d'absorption dans l'UV visible des extraits bruts au dichlorométhane (a) et au butanol (b) des surnagants de culture de l'isolat S ₆ dissous dans le méthanol.	98
Figure 43 : Spectres d'absorption dans l'UV visible des extraits bruts au dichlorométhane (a) et au butanol (b) des surnagants de culture de l'isolat S ₉ dissous dans le méthanol.	98
Figure 44 : Spectres d'absorption dans l'UV visible des extraits bruts à l' hexane (a) et au butanol (b) des surnagants de culture de l'isolat S ₁₇ dissous dans le méthanol.	99
Figure 45 : Spectres d'absorption dans l'UV visible des extraits bruts au benzène (a) et au butanol (b) des surnagants de culture de l'isolat S ₂₉ dissous dans le méthanol.	99
Figure 46 : Structure de la myukamycine, sels de sodium	103
Figure 47 : Structure de l'antibiotique polyéther: lasalocide	103

Liste des tableaux

Tableau I : Chimiotypes de parois	14
Tableau II : Importance médicale de certains antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyces</i>	17
Tableau III : Importance et rôles de genres sélectionnés d'actinomycètes	18
Tableau IV : Types de microorganismes halophiles (par Kushner, 1987)	21
Tableau V : Actinomycètes halophiles modérées isolées de différents environnements salins	24
Tableau VI : Classes d'antibiotiques en usage clinique et origine de l'organisme producteur	40
Tableau VII : Analyses physicochimiques des échantillons de sol de la région d'Iadnanen	61
Tableau VIII : Résultats de l'analyse granulométrique de l'échantillon de sol du site d'Iadnanen	62
Tableau IX : Action antagoniste des souches S ₆ , S ₉ , S ₁₇ et S ₂₉ vis-à-vis des bactéries, des champignons filamenteux et d'une levure sur milieu MULLER HINTON	65
Tableau X : Caractéristiques macromorphologiques des isolats S ₆ et S ₉	71
Tableau XI : Caractéristiques macromorphologiques des isolats S ₁₇ et S ₂₉	72
Tableau XII : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat S ₆ , en acides aminés et sucres, par chromatographie sur papier.....	75
Tableau XIII : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat S ₉ par chromatographie sur papier.....	75
Tableau XIV : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat S ₁₇ , par chromatographie sur papier.....	76
Tableau XV : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat S ₂₉ , par chromatographie sur papier.....	76
Tableau XVI : Caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'isolat S ₆	79
Tableau XVII : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats S ₉ , S ₁₇ , et S ₂₉ [<i>Streptomyces</i>].....	82

ANNEXE 5

Tableau XVIII : Résultats des révélations chimiques des extraits au dichlorométhane et au butanol du surnageant de culture de l'isolat S ₆	VII
Tableau XIX : Résultats des révélations chimiques des extraits au dichlorométhane et au butanol du surnageant de culture de l'isolat S ₉	VII
Tableau XX : Résultats des révélations chimiques des extraits à l'hexane et au butanol du surnageant de culture de l'isolat S ₁₇	VII
Tableau XXI : Résultats des révélations chimiques des extraits au benzène du surnageant de culture de l'isolat S ₂₉	VII

SOMMAIRE

Glossaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES ACTINOMYCETES : ECOLOGIE, TAXONOMIE ET IMPORTANCE.

1. Aperçu général sur l'écologie des actinomycètes	4
1.1. Ecologie des actinomycètes et leur distribution dans la nature	4
1.2. Techniques d'isolement	6
1.2.1. Milieux de cultures sélectifs	7
1.2.2. Techniques particulières d'isolement	8
2. Taxonomie et critères de classification des actinomycètes	9
2.1. Systématique des actinomycètes	9
2.2. Evolution des critères d'identification	10
2.3. Critères actuels d'identification	11
2.3.1 Caractères morphologiques	11
2.3.1.1. Caractères cultureux ou macromorphologiques	11
2.3.1.2. Caractères micromorphologiques	11
2.3.2. Critères chimiques : chimiotauxonomie	13
2.3.2.1. Composition pariétale en acides aminés	14
2.3.2.2. Composition cellulaire en sucres.....	14
2.3.2.3. Composition en lipides.....	15
2.3.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique	15
2.3.4. Critères moléculaires	16
3. Importance des actinomycètes	16
3.1. Dans les domaines médical, vétérinaire et industriel	17
3.2. Dans le domaine agronomique	18
3.3. Les actinomycètes en tant que microorganismes pathogènes	19
4. Les microorganismes halophiles	20
4.1. Actinomycètes et halophilie	20
4.1.1. Notions générales sur l'extrêmophilie	20
4.1.2. L'halophilie	20

4.1.3. Ecologie des microorganismes halophiles	22
4.2. Potentiel biotechnologique des organismes halophiles	25
4.3. Caractéristiques physiologiques des actinomycètes halophiles	26
4.4. Les mécanismes d'adaptation à la vie en milieu hypersalin	26
4.4.1. Régulation de la pression osmotique.....	27
4.4.2. Adaptation des protéines à l'hypersalinité	29

CHAPITRE II : METABOLISME SECONDAIRE DES ACTINOMYCETES

1. Cycle de développement des actinomycètes.....	31
2. Métabolisme général	32
2.1. Le métabolisme primaire	32
2.2. Le métabolisme secondaire	32
2.2.1. Les différentes familles d'antibiotiques	34
2.2.1.1. Les β - Lactames	35
2.2.1.2. Les Aminoglycosides	35
2.2.1.3. Les Tétracyclines.....	35
2.2.1.4. Les macrolides.....	35
2.2.1.5. Les Glycopeptides	36
2.2.1.6. Les rifamycines	36
2.2.2. Les enzymes	37
2.3. Métabolites secondaire produits par les actinomycètes halophiles	37
3. Les microorganismes producteurs d'antibiotiques.....	39

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

I. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens	42
1. Origine et prélèvement des échantillons et caractérisation physico-chimiques du sol	42
1.1. Origine et prélèvement des échantillons	42
1.2. Caractérisation physicochimique du sol.....	43
2. Méthodes d'isolement	44
2.1. Milieu de culture utilisé.....	44
2.2. Conservation des souches.....	44
II. Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes	45
1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide	45
1.1. Technique des stries croisées	46
1.2. Technique des cylindres d'agar.....	47
2. Production et détection des antibiotiques en milieu liquide.....	48
2.1. Technique des puits	48

III. Etude taxonomique des souches sélectionnées	49
1. Les souches sélectionnées	49
2. Etude des caractères morphologiques	49
2.1. Macromorphologie	49
2.2. Micromorphologie	49
3. Analyse des constituants cellulaires et pariétaux	50
3.1. Obtention de la biomasse	50
3.2. Détermination des acides aminés pariétaux	50
3.3. Caractérisation des sucres cellulaire	51
4. Etude des caractères physiologiques	52
4.1. Production de pigments mélanoides	52
4.2. Production de nitrate réductase	53
4.3. Tests de dégradation de divers composés organiques	53
4.4. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques	53
IV. Production, extraction, purification et caractérisation des antibiotiques synthétisés	54
1. Production d'antibiotiques en milieu liquide	54
1.1. Préculture	54
1.2. Culture	54
2. Extraction et purification des antibiotiques	54
2.1. Extraction par des solvants	54
2.1.1. A partir du mycélium	54
2.1.2. A partir du filtrat de culture	55
2.2. Antibiographie et choix du solvant d'extraction	55
2.2.1. Méthode des puits	55
2.3. Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)	58
2.3.1. Préparation des plaques de gel de silice	58
2.3.2. Développement des plaques et sélection du système d'élution	58
2.3.3. Bioautographie	59
3. Révélation chimique des antibiotiques	59
4. Etude spectroscopique des antibiotiques	60
4.1. Spectroscopie UV- visible.....	60

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens	61
1. Origine et prélèvement des échantillons et caractérisation physicochimique du sol	61
1.1. Origine des prélèvements et caractérisation physicochimique du sol	61
II- Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes	62
1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide	63
1.1 Méthode des stries croisées	63
1.2 Méthode des cylindres d'agar	64

2. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu liquide	68
3. Discussion	69
III. Etude taxonomique des souches sélectionnées	70
1. Détermination du genre	70
1.1. Etude des caractères morphologiques	70
1.1.1 Macromorphologie.	70
1.1.2. Micromorphologie.....	74
1.2. Analyse des constituants cellulaires et pariétaux	75
1.2.1. Détermination des acides aminés pariétaux	75
1.2.2. Caractérisation des sucres cellulaires	75
2. Détermination de l'espèce	78
2.1. Étude physiologique	78
IV. Production, extraction, purification et caractérisation des antibiotiques synthétisés	85
1. Production d'antibiotiques en milieu liquide	85
2. Extraction et purification des antibiotiques	85
2.1. Choix du solvant d'extraction des antibiotiques	86
2.1.1. Extraction à partir du filtrat de culture	86
2.1.2. Extraction à partir du mycélium	91
2.2. Mise en évidence des antibiotiques par bioautographie	91
2.2.1. Détection et semi-purification des antibiotiques	91
2.2.1.1. Développement des plaques et sélection du système d'élution	92
2.2.2. Bioautographie	95
3. Caractérisation partielle des extraits bruts d'antibiotiques	95
3.1. Révélation chimiques	95
3.2. Spectroscopie UV-visible	98
4. Discussion	102
Conclusion générale.	107
Références bibliographiques	112
Annexes	

Résumé

L'analyse de 11 échantillons de sol salin provenant de la région de Béjaia, en utilisant le milieu Williams modifié, a permis l'isolement de 156 souches d'actinomycètes.

Quatre souches ont fait objet d'une étude morphologique préliminaire ainsi que de leurs propriétés antagonistes. Ces deux études ont permis de rattacher la souche codée S₆ au genre *Streptovercillium* et les isolats S₉, S₁₇ et S₂₉ au genre *Streptomyces*.

L'étude chimiotaxonomique a permis de confirmer l'appartenance de ces isolats aux genres cités.

L'étude physiologique des souches a permis de déterminer leur capacité à se développer sur des milieux à haute concentration en NaCl atteignant 4M.

La production d'antibiotiques pour les 4 isolats est évaluée aussi bien sur milieu solide que sur milieu liquide en utilisant 6 germes bactériens, 3 champignons filamenteux et une levure comme microorganismes cibles, et les résultats obtenus ont montré des activités antibactériennes dirigées essentiellement vis-à-vis des bactéries à Gram +, des activités antifongiques ou encore antilevurienne.

Les activités antibactériennes et antifongiques des filtrats de culture des 4 isolats sont extraites par des solvants différents ; et le système éthanol- ammoniaque-eau (60/20/20) a permis une séparation optimale des substances bioactives.

Des révélations chimiques et une étude spectroscopique ont été réalisés sur les extraits bruts des filtrats de culture et les résultats indiquent l'absence de composés polyéniques mais aussi, que nos substances semblent avoir des propriétés analogues aux molécules de type polyéthers dont les caractéristiques biologiques et physicochimiques semblent coïncider avec nos résultats.

Mots clés : Actinomycètes halophiles, *Streptomyces*, *Streptovercillium*, Activité antibiotique.

Abstract

The analysis of 11 samples of saline soil coming from the area of Béjaia, by using the Williams medium modified, allowed the isolation of 156 strains of actinomycetes.

Four strains have been the subject of a preliminary morphological study and their antagonistic properties. These two studies made it possible to attach the coded strain S₆ to the *Streptoverticillium* genera and the isolates S₉, S₁₇ and S₂₉ to the *Streptomyces* genera.

The chemotaxonomic study made it possible to confirm the membership of these isolates to the quoted kinds.

The physiological study of the isolates made it possible to determine their capacity to develop on mediums with high NaCl concentration reaching 4M.

The production of antibiotics for the 4 isolates is evaluated as well on solid medium as on liquid medium by using 6 bacterial germs, 3 filamentous molds and a yeast *C. albicans* like target microorganisms.

The results obtained showed that the 4 isolates produce antibacterial activities directed primarily against Gram positive bacteria and antifungal activities. This production was not noticed on liquid medium.

The antibacterial and antifungal activities of the filtrates of culture of the 4 isolates are extracted by different solvents, and the ethanol-ammonia-water (60/20/20) allowed optimal separation of bioactive substances.

Chemical revelations and a spectroscopic study were carried out on the crude extracts of the culture filtrates of the 4 isolats and the results indicates the absence of polyenic compounds but also that our substances seem to have similar properties to the polyether type molecules whose biological and physico-chemical characteristics seem to coincide with our results:

Key words: Halophilic actinomycetes, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, antibiotic Activity.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le marché mondial des antibiotiques est passé de vingt cinq milliards de dollars en 1994 à trente et un milliards de dollars en 2003 et, durant cette période, l'augmentation la plus significative des ventes a concerné les fluoroquinolones et les macrolides tandis que la part des antiinfectieux dans le marché pharmaceutique global a diminué de 1,5% (**Colombié, 2005**).

Depuis la découverte de la pénicilline et de la streptomycine, un nombre important d'antibiotiques a été obtenu à partir de cultures liquides de microorganismes tels que les actinomycètes. En effet, Environ 70% de ces nouveaux métabolites bioactifs sont synthétisés par des actinomycètes (**Takahashi et Omura, 2003**). Le genre *Streptomyces* est le plus exploité pour ses nombreuses propriétés antagonistes et continue d'attirer l'intérêt de plusieurs laboratoires dans le monde. Il sécrète près de 80% des antibiotiques naturels commercialisés et utilisés en médecine (**Miyadoh, 1993 et Watve et al., 2001**).

En dépit de la longue liste d'antibiotiques actuellement disponibles sur le marché, les antifongiques représentent un faible pourcentage (**Gupte et al., 2002 & Augustine et al., 2005**).

Aujourd'hui, le besoin sans cesse croissant d'antifongiques nouveaux, sûrs, mais également efficaces est la préoccupation majeure des industries pharmaceutiques, particulièrement avec l'augmentation des infections opportunistes chez les hôtes immunodéprimés (**Gupte et al., 2002 ; Augustine et al., 2005 & Thakur et al., 2007**).

La résistance aux antibiotiques a connu une augmentation fulgurante durant cette dernière décennie. Ce phénomène alarmant est d'autant plus problématique particulièrement dans les environnements hospitaliers où des bactéries multi-résistantes apparaissent telles que *Staphylococcus aureus*, mais également l'apparition de nouvelles pathologies et l'évolution des maladies infectieuses (telles que le SIDA, le virus Ebola, la maladie du légionnaire... etc) (**Demain et Lancini, 2006**).

Deux solutions essentielles peuvent être utilisées afin de venir à bout de ce problème :

Une meilleure utilisation des antibiotiques et la réduction de leur consommation d'une part, et l'identification de nouvelles molécules bioactives d'autre part (**Strub et al., 2008**).

Ainsi, plusieurs stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces. L'une d'elles vise des souches provenant d'écosystèmes

extrêmes et particuliers (**Moncheva et al., 2002 ; Guezennec, 2004 & Demain et Lancini, 2006**). Ainsi, la recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinomycètes est crucial pour la découverte de nouvelles espèces et par conséquent la découverte éventuelle de nouveaux produits naturels bioactifs (**Hozzein et al., 2008**).

L'étude des milieux extrêmes, a ouvert la voie à la mise en évidence de microorganismes bien adaptés à ces conditions particulières et capables de synthétiser des molécules d'intérêt biotechnologique (**Guezennec, 2004**). En effet, cette fraction d'actinomycètes évoluant dans ces biotopes se révèle être une source potentielle d'antibiotiques (**Lazzarini et al., 2000 & Newman et al., 2003**).

En Algérie, les sols de palmeraies, qui constituent un écosystème particulier, renferment un potentiel assez riche en actinomycètes particulièrement les actinomycètes rarement isolés de part le monde tels que les genres *Planomonospora*, *Planobispora*, *Nocardiopsis*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*...etc, (**Sabaou et al., 1998**) qui se sont révélés être de grands producteurs de nouvelles molécules antimicrobiennes (**Zitouni et al., 2005 et Boudjella et al., 2006**).

D'après **Tang et al.** (2003), les actinomycètes halophiles ont suscité beaucoup d'intérêt depuis que de nouvelles substances bioactives ont été mises à jour (**Tang et al., 2003**).

Le choix d'un environnement riche en sel est basé, d'une part, sur la capacité d'adaptation de tels microorganismes à des environnements extrêmes grâce à des mécanismes d'adaptation spécialisés et d'autre part, à la diversité des substances produites, qui suggèrent que les voies métaboliques de ces microorganismes sont, également, diversifiées. Cependant, relativement peu de recherche ont été réalisées sur les actinomycètes halophiles, tels que leurs besoins nutritionnels, qui restent encore méconnus (**Tang et al., 2003**).

Dans le présent travail, nous nous sommes fixés comme objectifs, l'isolement de souches d'actinomycètes à partir d'échantillons de sol salins de la région de Bejaia puis l'étude de l'aptitude des isolats sélectionnés à produire des antibiotiques intéressants.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique détaillée sur les actinomycètes en général ainsi que sur leur métabolisme secondaire.

Nous présenterons l'écologie, la taxonomie et l'importance de ce groupe microbien dans différents domaines (industriel, médical, vétérinaire et agronomique) avec un intérêt particulier consacré aux actinomycètes halophiles.

Le deuxième volet est consacré au métabolisme secondaire des actinomycètes où nous avons traité succinctement le cycle de développement, le métabolisme général et les actinomycètes producteurs d'antibiotiques en particulier.

La seconde partie du document traite les principes généraux des matériels et méthodes utilisés à savoir :

- L'isolement des souches d'actinomycètes ;
- La mise en évidence des activités antibiotiques ;
- La production et l'extraction des substances actives produites ; et
- La caractérisation partielle de ces dernières.

Enfin la troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**CHAPITRE I : LES ACTINOMYCETES : ECOLOGIE, TAXONOMIE ET IMPORTANCE.****1. Aperçu général sur l'écologie des actinomycètes.****1.1. Ecologie des actinomycètes et leur distribution dans la nature**

D'après **Waksman** (1961), Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un actinomycète en 1875 et en 1878, Harz, nomma *Actinomyces bovis*, un organisme parasite rencontré dans une infection de la mâchoire d'un bovin. Depuis, les actinomycètes ont été isolés des sols, des matières organiques en décomposition, des eaux, de presque tous les habitats où la vie est possible. (**Theilleux, 1993 & Bergey's manual, 2007**).

Les actinomycètes sont des bactéries Gram + avec une proportion de G+C élevée (>55 mol %) formant des colonies à la morphologie complexe, (**Colombié, 2005 et Pizzul, 2006**) cependant, leur morphologie diffère selon les genres.

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (**Larpen et Sanglier, 1989 & McNeil et Brown, 1994**).

La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, composts, eau, fourrages, fumiers, grains, canne à sucre, etc, et dans des zones géographiques variées : l'extrême nord, l'arctique, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts (**Lacey, 1997 ; Harvey, 1999 ; Badji, 2006 & Pataraya et al., 2008**). La plupart d'entre eux sont saprophytes mais quelques-uns peuvent être pathogènes ou symbiotes de plantes ou d'animaux (**Badji, 2006 et Singh et al., 2006**).

- **Milieu terrestre**

Les actinomycètes sont généralement considérés comme des bactéries telluriques à cause de leur large distribution et abondance dans le sol (**You et Park, 1996**). Ils représentent le groupe de microorganismes le plus largement distribué dans la nature (**Oskay et al., 2004 ; Singh et al., 2006 & Narayana et al., 2008**).

Numériquement, ils sont moins prédominants que les autres bactéries mais bien plus que les moisissures. Toutefois, les actinomycètes sont en général plus nombreux que presque tous les autres groupes bactériens considérés individuellement (**Harvey, 1999**).

Leur nombre, variable selon les biotopes, atteint souvent 10^6 par gramme de terre sèche (**Larpen et Sanglier, 1989 ; Takahashi et al., 1996 ; Harvey, 1999 & Pizzul, 2006**).

Ce sont des microorganismes communs du sol, où leur production de composés odorants tels que la géosmine et le 2- méthylisoborneol (MIB) contribuent significativement dans les caractéristiques odorantes du sol (**Zaitlin et Watson, 2006**).

- **Sols sahariens**

Dans les sols sahariens, les actinomycètes constituent 15 à 60% de la microflore tellurique avec une prédominance des *Streptomyces* et quelquefois des *Micromonospora*.

Ce pourcentage est encore plus élevé (jusqu'à 91%) dans les horizons de sol situés entre 1 et 2 mètres de profondeur (**Nouasri, 1996**).

Ces sols ont montré une grande diversité en genres d'actinomycètes, des plus abondants aux plus rares, voir même très rares dans le monde. C'est le cas des genres *Actinomadura*, *Nocardioides*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Spirilospora*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Oeskovia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*, etc (**Boudjella, 2007**).

Les genres *Saccharothrix* et *Nocardiopsis* ont été isolés en très petits nombres à partir de divers substrats et écosystèmes. Leur pourcentage par rapport au total des actinomycètes oscille entre 0 et 0,5 % dans le monde (**Athalye et al., 1985 et Zitouni, 2005**).

La densité des actinomycètes dans les sols de surface des palmeraies oscille entre 5×10^5 et 5×10^6 ufc/gss (unités formant colonies par gramme de sol sec) ; ils représentent 15 à 80 % de la microflore totale dans les sols moyennement, peu ou pas salés. Le genre *Streptomyces* prédomine dans la majorité des échantillons (80 à 90 % du total), suivi de *Micromonospora* et de *Nocardia*.

- **Milieu marin**

Certaines souches d'actinomycètes ont été retrouvées dans des environnements marins (**Singh et al., 2006 & Imada et al., 2007**). En effet, ils sont présents dans les fonds fluviaux ou lacustres. La colonisation normale du milieu marin est un point controversé, selon les uns, il existerait une flore d'actinomycètes spécifique aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible ; selon d'autres, les actinomycètes isolés de ces milieux correspondraient à des souches terricoles adaptées à la salinité marine (**Larpen et Sanglier, 1989 ; Theilleux, 1993 & Okazaki, 2006**).

Cependant, en 2002, **Mincer et al.**, ont isolé des souches Actinomycetales à partir du milieu marin, nécessitant de l'eau de mer pour leur croissance, et ces souches ont été désignées comme actinomycètes marines. En effet, un grand nombre d'actinomycètes ont été isolés de la mer profonde, un environnement à forte pression, à basse température, absence de lumière, à concentrations variables d'oxygène et de sel, preuve d'une vaste distribution de ces groupes de part le monde (**Pizzul, 2006**).

D'après l'étude de **Duckworth et al.** (1996), des actinobactéries et des firmicutes ont été mis en évidence au sein de six lacs alcalins situés au Kenya et en Tanzanie, (**Duckworth et al., 1996**). Par ailleurs, il a été constaté par **Zaitlin et Watson** (2006), que le genre *Micromonospora* est plus abondant que le genre *Streptomyces* au niveau des sédiments des lacs (**Zaitlin et Watson, 2006**). Cependant, un grand nombre de questions restent encore sans réponses ; telles que la fonction écologique des actinomycètes dans l'environnement marin, aussi bien leur distribution biogéographique que l'histoire de leur évolution (**Pathom-aree, 2006 & Mitra et al., 2008**).

La plupart des actinomycètes sont capables de former des spores, dotées de capacité de survie dans des conditions extrêmes telles que la salinité, et jouent un rôle important dans la dispersion par le vent et les courants d'eau (**Zaitlin et Watson, 2006**). Cette capacité de sporulation est très importante pour leur survie dans l'environnement (**Pizzul, 2006**).

D'après **Theilleux**, (1993) et **Jayasinghe et Parkinson** (2008), des études écologiques sur les actinomycètes dans les sols ont été effectuées sur des habitats aussi variés que des prairies, des sables de plages, des caves souterraines, des champs de riz ainsi que des glaciers de l'antarctique. Toutes ces études montrent que les facteurs contrôlant la densité et la diversité des actinomycètes dans les sols sont relatifs à :

- La teneur en humidité ;
- pH ;
- La nature et l'abondance de la matière organique ;
- La profondeur ; 2 à 15 cm est généralement la profondeur optimale ; la rhizosphère est plus riche en actinomycètes ; leur nombre diminue avec la profondeur (**Theilleux, 1993 ; Jayasinghe et Parkinson, 2008 & Kämpfer, 2006**).

1.2. Techniques d'isolement

La mise en évidence des actinomycètes nécessite souvent leur isolement sélectif du reste des microorganismes. Cet isolement consiste généralement à exercer une répression orientée pour défavoriser la croissance des microorganismes indésirables d'une part et à favoriser l'apparition et la croissance des groupes recherchés d'autre part (**Zitouni, 2005**)

et cela inclus le prétraitement des échantillons de sol ainsi que la variation dans la formulation des milieux de culture qui est le cas le plus fréquent (**Matsumoto et al., 2006 & Vijayakumar et al., 2007**).

D'après **Suzuki et al.** (1994), un nombre considérable de résultats ont été rapporté suite à l'application de prétraitements des échantillons de sols dans un but d'isolement sélectif de genres d'actinomycètes. Parmi ces prétraitements :

- Le chauffage du sol à une température de 100°C pendant 1h dans le but d'isoler le genre *Microbispora* et les genres apparentés.
- Garder les échantillons de sol à une température de 40°C pendant 2 à 16 h afin d'isoler le genre *Streptomyces* à partir des racines et du sol.
- Chauffage des échantillons d'eau et de sol à une température de 55°C pendant 6 minutes afin d'isoler le genre *Rhodococcus*.
- Traitement du sol à 100°C pendant 15 minutes afin de sélectionner le genre *Actinomadura* (**Suzuki et al., 1994**).

L'étude effectuée par **Otoguro et al.** (2001), a permis de déterminer que le traitement des échantillons de sol par le carbonate de Calcium (**El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**) couplé à la méthode de centrifugation-réhydratation permet l'isolement sélectif du genre *Actinokineospora spp.* (**Hayakawa, 2008**).

L'utilisation d'antibiotiques comme pression sélective renforce également l'isolement des actinomycètes à partir des sols.

L'addition de 5 à 25 µg/ml de Novobiocine dans le milieu d'isolement augmente le nombre du genre *Micromonospora*, la Tunicamycine à 25 à 50 µg/ml en combinaison avec un prétraitement alcalin du sol augmente également le nombre de *Micromonospora* (**Suzuki et al., 1994**).

1.2.1. Milieux de cultures sélectifs

L'isolement des microorganismes est fonction du type d'habitat, des traitements effectués sur le matériel, des milieux gélosés utilisés et des conditions d'incubation.

La mise au point de milieux sélectifs se base sur l'addition de composés toxiques pour certains groupes de microorganismes et la sélection de composants du milieu favorisant la croissance d'un groupe particulier. En effet, les contaminations par les champignons sont supprimées par l'addition d'antifongiques tels que l'actidione et la nystatine, inversement, les bactéries sont éliminées par des agents tels que le chloramphénicol, la kanamycine et la tétracycline (**Deshayes et al., 1989**). Des milieux composés de sources de carbone et d'azote difficilement assimilables par les microorganismes autres que les actinomycètes ont été développés pour l'isolement sélectif de ces

derniers, notamment le milieu amidon-caséine-agar qui est le plus généralement utilisé (**Kuster et Williams, 1964**).

Ainsi, les milieux de culture doivent être conçu de manière à réduire le développement d'autres microorganismes sans pour autant nuire au développement des actinomycètes (**Hayakawa, 2008**), tels que les milieux additionnés de vitamines et de sels minéraux, notamment les milieux chitine – vitamine B et acide humique-vitamine B (Hayakawa et Nonomura, 1984 ; 1987) et le milieu charbon –vitamine B (**You et Park, 1996 ; Boudjella, 2007 & Vijayakumar et al., 2007**).

1.2.2. Techniques particulières d'isolement

Le nombre d'actinomycètes dit « rares » (non *Streptomyces*) est en augmentation dû à l'application de nouvelles méthodes d'isolement plus sélectives (**Pizzul, 2006**). En effet, un certain nombre de méthodes furent développées pour la mise en évidence et l'isolement de groupes particuliers d'actinomycètes. Telle la méthode mise au point par Palleroni (1980), qui est une technique efficace pour l'isolement d'actinoplanètes et est basée sur la mobilité des spores et leur chimiotropisme vis-à-vis des ions chlorures (**Deshayes et al., 1989**). La figure (1) représente deux cupules entre lesquelles se trouve un canal renfermant un tampon permettant ainsi le déplacement des spores mobiles.



Figure 1 : Enrichissement des actinomycètes mobiles à partir des échantillons de sol (**Hayakawa, 2008**).

D'après **Hayakawa**, (2008), grâce à la combinaison des prétraitements et la composition des milieux de culture additionnés d'antibiotiques spécifiques, des genres d'actinomycètes rares, qui, ont été précédemment isolés accidentellement en usant les techniques de dilutions conventionnelles, peuvent actuellement être isolées avec succès (**Hayakawa, 2008**).

2. Taxonomie et critères de classification des actinomycètes

2.1. Systématique des actinomycètes

Les actinomycètes sont rattachés au phylum des *Actinobacteria*, à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae* et à l'ordre des *Actinomycetales* créé par Buchanan en 1917 (**Bergey's manual, 2007**).

Dans la version 2004 du manuel de la systématique bactériologique (Bergey), l'ordre des *Actinomycetales* comptait 9 sous ordres, 38 familles et 121 genres.

Plusieurs réévaluations systématiques récentes de l'ordre reflètent l'intégration de données moléculaires (la séquence du gène ARNr 16s).

Actuellement, le phylum *Actinobacteria* tel qu'il figure dans le *Bergey's manual* (2007) renferme une seule classe : *Actinobacteria*, cette classe est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces. (**Bergey's manual, 2007**).

Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C%, allant de 51% chez certaines *Corynebactéries*, à plus de 70% chez les genres *Streptomyces* et *Frankia*, (**Ventura et al., 2007**) et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie.

Les actinomycètes possèdent des aspects biologiques caractéristiques tels que des formes de croissance mycéliennes ainsi qu'une capacité de production d'une large variété de métabolites secondaires incluant la majorité des antibiotiques.

D'après les systèmes conventionnels de classification des différents auteurs (Baldacci, 1958; Couch, 1963; Krassilnikov, 1949; Lechevalier et al. 1961; Cross et al. 1963; Nonomura et Ohara, 1957; Waksman, 1961), les espèces actinomycetales sont groupées ensembles dans des genres ou des familles séparées sur la base de leur caractéristiques morphologiques et écologiques (**Yamaguchi, 1965**), chimiques, physiologiques et moléculaires.

Les Streptomycètes représentent l'un des taxa appartenant à l'ordre des *Actinomycetales* qui renferment une diversité de morphotypes, comprenant des formes unicellulaires sphériques, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés. En effet, la famille *Streptomycetaceae* comprend 10 genres : *Streptoverticillium*, *Streptacidiphilus*, *Microellobosporia*, *Kitasatospora*, *Kitasatoa*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Actinosporangium*, *Actinopycnidium* et *Streptomyces* et plus d'une centaine d'espèces.

Cependant, les genres *Actinosporangium*, *Actinopycnidium*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Microellobosporia* et *Kitasatoa*, suite à l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire, notamment, le séquençage de l'ADNr 16s, ont été assimilés au genre *Streptomyces*. (**Bergey's manual, 2007**).

Toutefois, le statut taxonomique des genres *Streptoverticillium* et *Kitasatosporia* est devenu incertain depuis que les membres de ces genres ont fait objet d'analyses phylogénétiques. En effet, **Witt et Stackebrandt**, (1990) ont proposé l'unification des genres *Streptomyces* et *Streptoverticillim*, alors que **Wellington et al.** (1992) ont proposé que le genre *Kitasatosporia* devait être synonyme du genre *Streptomyces* sur la base des analyses phenétiques et des homologues des séquences de l'ARNr 16s (**Ochi et Hiranuma, 1994 et Kämpfer, 2006**).

2.2. Evolution des critères d'identification.

La systématique bactérienne a subi plusieurs modifications durant les trois dernières décennies dues à l'application de nouvelles techniques biochimiques, chimiques, génétiques, numériques et biologie moléculaire. (**Abbas, 2006**).

Cette évolution fut marquée par quatre périodes essentielles dont chacune a apporté de nouveaux critères de classification.

Lors de la première période, seuls les critères macro- et micromorphologiques, permettaient de distinguer les différents genres entre eux.

Cette période s'est étendue jusqu'au début des années 60, (**Pridham et al., 1958; Tresner et al., 1961**, rapporté par **Zitouni, 2005**).

La seconde période, qui a débuté à partir des années 60, a vu le développement de la chimiotaxonomie qui est basée sur l'analyse des constituants cellulaires tels les acides aminés (**Becker et al, 1964 ; Staneck et Roberts, 1974**), les sucres cellulaires (**Lechevalier et Lechevalier, 1970a**). Il en est de même pour l'analyse des lipides membranaires et pariétaux tels que les acides mycoliques (**Mordarska et al., 1972; Minnikin et al., 1977**), les phospholipides (**Lechevalier et al., 1977 ; Minnikin et al., 1977**), les ménaquinones (**Collins et Jones, 1981**) et les acides gras (**Grund et Kroppenstedt, 1990**). La chimiotaxonomie combinée aux critères morphologiques fut d'un apport essentiel dans la différenciation de nouveaux genres.

La troisième période, qui a débuté dans les années 70, avec une apogée entre 1980 et 1990 combine l'outil informatique aux tests physiologiques.

La taxonomie numérique basée sur des tests physiologiques analysés par ordinateur grâce à des logiciels adéquats a permis d'apporter beaucoup de clarté (**Grund et Kroppenstedt, 1990**).

Bien que les résultats obtenus étaient assez concluants, les taxonomistes abandonnèrent ces critères au profit des critères moléculaires, beaucoup plus performants.

La dernière période, fut celle de l'application des méthodes d'analyse génétiques et moléculaires, qui ont débuté durant les années 80.

Pour ce fait, plusieurs techniques ont été utilisées, telles que l'hybridation ADN-ADN, la détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de guanine - cytosine), le séquençage de l'ADN ribosomique 16S et 23S, etc.

2.3. Critères actuels d'identification

2.3.1 Caractères morphologiques

Les caractères morphologiques ont trait aux caractéristiques culturelles et micromorphologiques. Les critères morphologiques sont énoncés dans les « Bergey's Manual » de 1989 et 1994 (**Boudjella, 2007**).

2.3.1.1. Caractères cultureux ou macromorphologiques

D'après **Nouredine**, (2006) et **Boudjella**, (2007), les caractères cultureux contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux :

Parmi les caractères cultureux importants :

- La production d'un mycélium aérien (MA) (cas de nombreux genres) ou non (ex *Actinoplanes*, *Micromonospora* et *Rhodococcus* ;
- La présence ou non de mycélium du substrat (MS) ;
- La couleur du MA et du MS. La couleur exacte peut être définie à l'aide d'une charte de couleur ;
- La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

2.3.1.2. Caractères micromorphologiques

Les critères micromorphologiques importants selon **Nouredine**, (2006) et **Boudjella**, (2007).

- La fragmentation ou non du MS ;

- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur la MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaînes) ; la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) ;
- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur la MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores ;
- La présence de spores mobiles (ex : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres...) ;
- La formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou de structures spéciales telles que les synnemata (*Actinosynnema*), les sclérotés, etc...

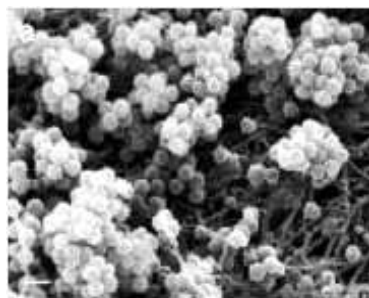
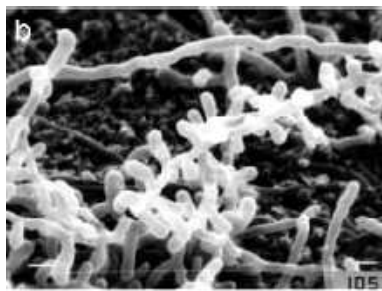
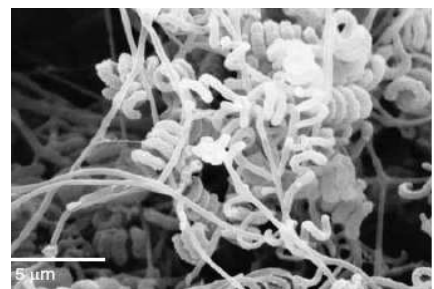
(a) *Micromonospora* sp.(b) *Saccharomonospora* sp.(c) *Streptomyces violaceusniger*

Figure 2 : Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes non mobiles monosporulés (Hayakawa *et al.*, 2004 et Hayakawa, 2008).

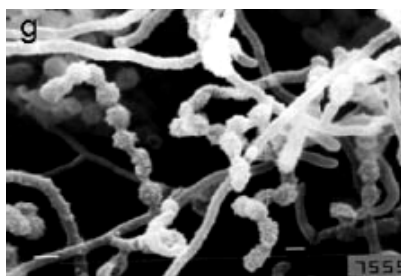
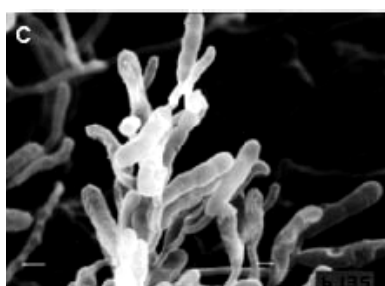
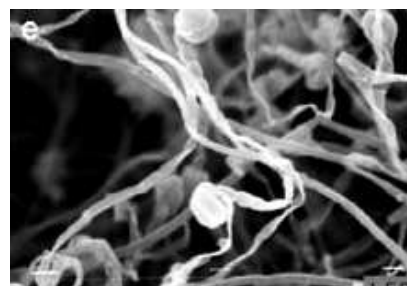
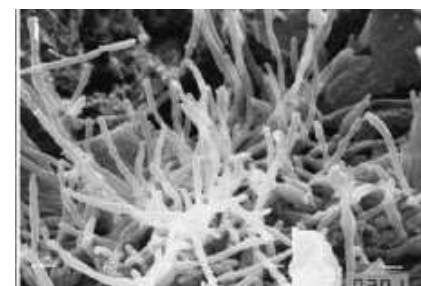
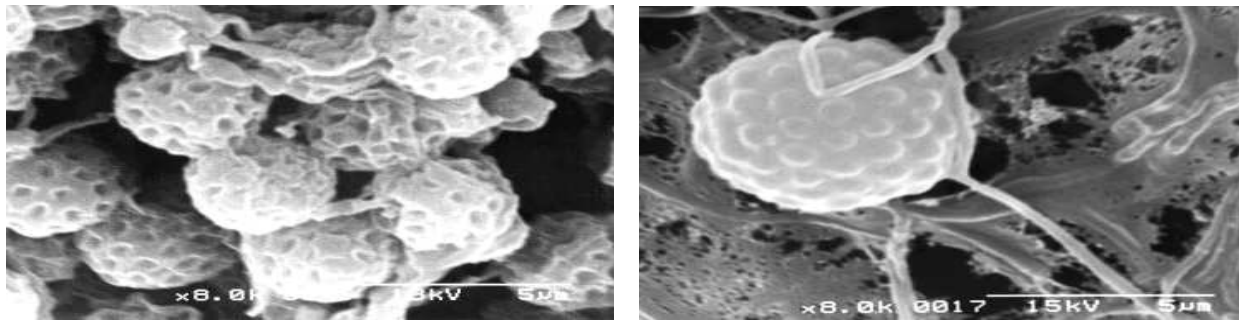
(a) *Actinomadura* spp.(b) *Microbispora*(c) *Microtetraspora* sp.;(d) *Nonomuraea* sp.;(e) *Pseudonocardia* sp.

Figure 3 : Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes non mobiles dotés d'oligosporés (Hayakawa, 2008).



Streptosporangium sp

Figure 4 : Photographies au microscope électronique d'un isolat d'actinomycète non mobile à sporanges (Ara et Kudo, 2007).



(a) *Actinoplanes sp.*

(b) *Dactylosporangium spp.*

(c) *Cryptosporangium spp*

Figure 5 : Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes mobiles à sporanges. (Hayakawa, 2008).

2.3.2. Critères chimiques : chimiotaaxonomie

Si pour certains genres, les caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance, la grande majorité par contre (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Nocordioides*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Soccharothrix*, *Kitasatosporia*, *Glycomyces*, etc.) nécessite une étude chimique de leurs constituants cellulaires (Boudjella, 2007).

La chimiotaaxonomie est l'étude des variations chimiques dans les organismes et l'utilisation de caractères chimiques dans la classification et l'identification.

C'est l'une des méthodes utilisées pour identifier les genres d'actinomycètes.

Les études effectuées par Cummins et Harris (1956), Roman et Nickerson (1956) et Hoare et worke (1957) rapportées par Becker *et al.*, (1965) ont établi que les actinomycètes avaient une paroi cellulaire de composition très proche de celle des bactéries à Gram positif et ont également indiqué que la composition chimique de la paroi cellulaire pourrait fournir des méthodes pratiques afin de différencier les genres d'actinomycètes (Becker *et al.*, 1965).

Becker et al., (1965), **Yamaguchi** (1965) et **Lechevalier et Lechevalier** (1970b) divisèrent les actinomycètes en chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires (**Boudjella, 2007**). (**Tableau I**)

2.3.2.1. Composition pariétale en acides aminés

La présence de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) est l'une des propriétés les plus importantes de la paroi cellulaire des bactéries Gram positif et des actinomycètes.

Si le DAP est présent, les bactéries contiennent généralement l'un des isomères : la forme LL ou la forme *meso* (DL) et ce suivant les genres.

Chez quelques actinomycètes, le DAP peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique (**Becker et al., 1965**).

2.3.2.2. Composition cellulaire en sucres

Sur la base de la composition des cellules en acides aminés et en sucres, plusieurs chimiotypes ont ainsi été définis:

Tableau I : Chimiotypes de parois (Larpent, 2000).

Type	Genres
Type I : LL- DAP, Glycine	<i>Streptomyces, Streptovercillium, Nocardioides, Intrasporangium, Kineosporia, Sporichthya, Arachnia, Pimelobacter</i>
Type II : <i>meso</i> DAP, Glycine, arabinos	<i>Micromonospora, Glycomyces, Actinoplanètes (Actinoplane Ampullariella, Catellatospora, Dactylosporangium, Pilimelia)</i>
Type III : <i>meso</i> DAP, Galactose	<i>Thermomonospora, Spirillospora, Thermoactinomyces, Nocardiosis, Streptosporangium, Geodermatophilus, Microtetraspora, Brevibacterium, Dermatophilus, Frankia, Maduromycètes (Actinomadura, Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Streptosporangium) Saccharothrix, Streptoalloteichus, Nocardia, Corynebacterium, Mycobacterium, Actinobispora, Caseobacter, Rhodococcus</i>
Type IV : <i>meso</i> DAP, Arabinose, Galactose	<i>Kibdelosporangium, Actinopolyspora, Amycolata, Amycolatopsis, Saccharopolyspora, Kibdelosporangium, Pseudonocardia, Saccharomonospora.</i>

Type V : Lysine, Ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
Type VI : Lysine, Acide aspartique	<i>Actinomyces bovis, Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora, Arcanobacterium</i>
Type VII : DAB Glycine, Lysine (+/-)	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
Type VIII : Ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

Toutes les parois contiennent les molécules suivantes : glucosamine, acide muramique, alanine, acide glutamique.

DAP : acide diaminopimélique

DAB : aide diaminobutyrique

2.3.2.3. Composition en lipides

L'analyse des lipides est un autre élément qui, tout comme le type de paroi cellulaire, fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification microbienne.

En effet, une classe de lipides terpéniques, les quinones respiratoires ou isopréniques, ont un potentiel considérable comme marqueurs taxonomiques. Il existe 2 genres majeurs de quinones respiratoires chez les bactéries soit les ménaquinones (mieux connues sous le nom de vitamine K2) et les ubiquinones (aussi appelées coenzyme Q). La classification bactérienne repose donc sur les degrés de saturation et la longueur de leurs chaînes latérales (**Harvey, 1999**).

2.3.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique.

En plus des caractères morphologiques, la détermination des espèces se base également sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc).

Devant des données souvent trop importantes (en raison du nombre trop élevé de tests et de souches), les systématiciens ont appliqué durant une longue période la taxonomie numérique aux actinomycètes.

C'est une méthode de classification développée à la fin des années 1950 qui consiste à utiliser un grand nombre de caractères physiologiques et biochimiques, tous considérés d'égale importance, et permet de définir des pourcentages de similarité entre les organismes grâce à l'utilisation de coefficients (de Jaccard, etc.). Plusieurs groupes ou « cluster » sont ainsi formés suivant les ressemblances des souches définies par un indice de similarité (**Sneath, 1989**).

La taxonomie numérique a également apporté plus de clarté dans la reconnaissance des espèces, auparavant très confuse. Goodfellow (1971) fut l'un des premiers à avoir appliqué cette analyse aux actinomycètes (**Nouredine, 2006**).

2.3.4. Critères moléculaires

Depuis que la biologie moléculaire a fait son apparition, vers le début des années 1980, les tests de routine commencent lentement à être remplacés par les techniques moléculaires. Grâce à la biologie moléculaire, plusieurs alternatives sont maintenant possibles dans un délai de quelques jours seulement à comparer à quelques semaines avec les méthodes traditionnelles.

Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, nous citerons l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%), ainsi que l'analyse des séquences des protéines ribosomiques.

3. Importance des actinomycètes

Les actinomycètes possèdent une importance économique majeure.

Les actinomycètes, bactéries filamenteuses sont des microorganismes saprophytes du sol dans lequel ils contribuent significativement dans la dégradation de polymères complexes tels que : la lignocellulose, l'hemicellulose, la pectine et la chitine (**Abou-Elela et Ghanem, 2005 ; Pizzul, 2006 & Vijayakumar et al., 2007**).

La principale raison derrière l'engouement pour les actinomycètes vient du fait qu'ils possèdent des rôles importants dans le sol et dans les interactions avec les plantes, (**Conn, 2005**), mais également pour la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt biotechnologique.

Il a été estimé que sur 16500 antibiotiques connus, 8700 (53%) sont produits par les actinomycètes dont 6550 (40%) par des espèces de *Streptomyces* (**Choulet, 2006 et Pizzul, 2006**).

Ils présentent une variété de cycles vitaux qui sont uniques parmi les procaryotes et jouent un rôle majeur dans le recyclage de la matière organique dans l'écosystème du sol (**Hirsch et Christensen, 1983**).

En plus de la production d'antibiotiques, les actinomycètes produisent un grand nombre d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activités, tels que des inhibiteurs d'enzymes, immunosuppresseurs, toxines et pesticides (**Dairi, 2005 et Pizzul, 2006**).

3.1. Dans les domaines médical, vétérinaire et industriel

D'après **Anibou et al.** (2008), une analyse a été réalisée sur le nombre de substances médicamenteuses utilisées en chimiothérapie cancéreuse et indique que plus de 60% des médicaments approuvés dérivent de composés naturels et la plupart ont été extraits à partir d'actinomycètes, tels que l'actinomycine D et la mitomycine (**Demain et Lancini, 2006**), et enzymes telles que des cellulases et des xylanases utilisés dans le traitement des effluents (**Basilio et al., 2003 et Oskay et al., 2004**).

Les actinomycètes ont fourni un nombre considérable de composés bioactifs de haute valeur commerciale, et sont recherchés de façon routinière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives (**Vijayakumar et al., 2007**).

Le tableau (II), donne des indications sur les effets que ces composés bioactifs ont sur certaines maladies mortelles et fait également le point sur le nombre et la diversité des composés produits par le genre *Streptomyces*.

Tableau II : Importance médicale de certains antibiotiques produits par le genre *Streptomyces* (**Chater, 2006**).

Organisme ou maladie ciblée	Antibiotiques	Organisme producteur
Typhoïde	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Tuberculose et Lèpre	Rifampicine	<i>Amycolatopsis (Streptomyces mediteranei)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> méthicilline résistant (SARM)	Vancomycine	<i>Amycolatopsis (Streptomyces orientalis)</i>
Cancer	Daunomycine	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>
Pathogènes résistants à la pénicilline	Acide clavulonique	<i>Streptomyces clavuligerus</i>

Les antibiotiques ont aussi trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux (**Khachatourians, 1998**). Ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies des animaux et des plantes, mais aussi dans l'alimentation pour accroître les rendements zootechniques (**Khachatourians, 1998 et Schwarz et al., 2001**).

Le tableau III (page 18) résume l'importance économique de quelques genres impliqués dans différents domaines.

Tableau III : Importance et rôles de genres sélectionnés d'actinomycètes (Zaitlin et Watson, 2006).

Pathogènes pour l'homme	Nodulation des racines	Production d'antibiotiques	Production de Géosmine/MIB
<i>Actinomyces</i>	<i>Frankia</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Microbispora</i>
<i>Arachnia</i>		<i>Actinoplanes</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Dermatophilus</i>		<i>Actinosynnema</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Micromonospora</i>		<i>Dactylosporangium</i>	
<i>Nocardia</i>		<i>Kibdelosporangium</i>	
<i>Oerskovia</i>		<i>Kitasatosporia</i>	
<i>Rhodococcus</i>		<i>Microbispora</i>	
<i>Rothia</i>		<i>Micromonospora</i>	
<i>Streptomyces</i>		<i>Nocardia</i>	
<i>Thermopolyspora</i>		<i>Saccharopolyspora</i>	
		<i>Streptoalloteichus</i>	
	<i>Streptomyces</i>		
	<i>Streptosporangium</i>		
	<i>Streptoverticillium</i>		

3.2. Dans le domaine agronomique

En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinomycètes possèdent d'autres potentiels intéressants tels que leur implication dans le processus de recyclage. En effet, ils sont vitaux pour le recyclage des nutriments et comptent parmi un nombre réduit d'organismes utilisés en biorémediation, capable de dégrader des composés organiques complexes tels que la chitine (Zaitlin et Watson, 2006 & Pizzul, 2006), grâce à un potentiel enzymatique riche ainsi que des spores résistantes à la dessiccation (Pizzul, 2006). Les actinomycètes peuvent jouer un rôle important dans le processus de biodégradation durant le traitement biologique. Ils ont l'avantage sur les autres microorganismes d'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire et sont capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes (El-Shatoury *et al.*, 2004).

Une autre caractéristique intéressante de ces microorganismes, concerne la capacité de dégradation de composés hydrophobes. Dans ce cas, leur activité est due :

a) la production de biosurfactants extracellulaires, particulièrement des glycolipides, tels le tréhalose produit par les espèces du genre *Rhodococcus*,

b) la production de biosurfactants cellulaires tels que les acides mycoliques conférant aux cellules microbiennes la capacité d'adhérer aux phases hydrophobes (**Pizzul, 2006**).

Le genre *Frankia* est également très important pour un bon nombre de plantes, provoquant des nodulations aux racines permettant ainsi la fixation de l'azote par la plante hôte (**Zaitlin et Watson, 2006**).

Un isolat de l'espèce *Micromonospora purpurea* isolé à partir de sédiments du lac Baikal, a présenté la capacité à dégrader le phtalate à 4°C.

Des isolats de *Streptomyces sp.* isolés à partir de la rivière du Danube sont capables de dégrader l'acide phtalique, le benzène, les dérivés du benzoate et les alcools aliphatiques.

Les actinomycètes peuvent également jouer un rôle dans la décomposition des algues bleues et d'autres bactéries. Une étude effectuée par Yammamoto et *al.* (1998), sur un actinomycète identifié comme l'espèce *Streptomyces phaeofaciens*, a révélée que celui-ci était capable de provoquer la lyse des cellules de la Cyanobactérie *Microcystis aeruginosa*, suggérant qu'il peut être intéressant comme agent de contrôle des cyanobactéries (**Zaitlin et Watson, 2006**).

3.3. Les actinomycètes en tant que microorganismes pathogènes

L'ordre des Actinomycetales renferme également des genres pathogènes tels que l'espèce *Actinomyces israelii*, cause principale des caries dentaires ainsi que d'autres infections humaines sérieuses :

Mycobacterium tuberculosis est l'agent responsable de la tuberculose, une maladie, qui selon les données de l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2004, aurait causé plus de 1,7 millions de morts. Une autre espèce du genre *Mycobacterium*, *M. leprae* : agent causal de la lèpre et aussi *Corynebacterium diphtheriae* : causant la diphtérie. D'autres genres sont également responsables d'infections sérieuses chez l'homme et l'animal, tels que *Nocardia*, en particulier l'espèce *Nocardia asteroides*. En effet, d'après **McNeil et Brown, (1994)** il a été rapporté des cas d'infections aussi bien chez les animaux domestiques que sauvages: tels que les chiens, les chats, les chevaux, les oiseaux et les renards (**McNeil et Brown, 1994**), *Rhodococcus*, *Gordonia* et *Actinomadura*, par ailleurs, ce dernier est responsable des infections cutanées des pieds connues sous le nom de Mycétome (**McNeil et Brown, 1994 et Conn, 2005**).

Il existe relativement peu d'actinomycètes phytopathogènes. Ils appartiennent au genre *Corynebacterium* et *Streptomyces*. (Conn, 2005 et Pizzul, 2006).

Des désordres respiratoires allergiques (AAE) peuvent également être causés par une exposition aux spores d'actinomycètes thermophiles issues de matériels organiques en décomposition tel le compost (maladie du champignoniste) ou bien le foin moisi (poumon du fermier), ce dernier, principal représentant de l'AAE, est surtout causé par l'espèce *Saccharopolyspora rectivirgula* (Harvey, 1999 et Ranalli *et al.*, 1999).

4. Les microorganismes halophiles

4.1. Actinomycètes et halophilie

4.1.1. Notions générales sur l'extrêmophilie

L'extrêmophilie désigne l'aptitude de certains organismes à se développer dans des conditions physiques et chimiques défavorables pour la plupart des organismes vivants (Lefebvre, 2005).

Les extrêmophiles sont des microorganismes capables de croître et de se développer dans des conditions extrêmes de pH, de température, de salinité et d'absence d'oxygène. (Echigo *et al.*, 2005 et Le Borgne *et al.*, 2008).

4.1.2. L'halophilie

Parmi les domaines les plus étudiés de l'extrêmophilie se trouvent les hautes températures (thermophilie), mais aussi les fortes salinités (halophilie) (Lefebvre, 2005).

Il n'existe pas de définition propre au terme « halophile », certains utilisent ce terme pour tout organisme nécessitant un certain taux de sel pour sa croissance incluant des concentrations atteignant 35g/l comme celle de l'eau de mer (Oren, 2008).

Les organismes halophiles sont des organismes qui affectionnent les environnements hypersalins. Ce groupe d'organismes renferme aussi bien des procaryotes que des eucaryotes qui possèdent la capacité de maintenir en équilibre la pression osmotique cellulaire mais aussi, parviennent à résister aux effets dénaturants des sels (DasSarma et Arora, 2001).

Les bactéries et les actinomycètes halophiles ont été regroupés suivant les exigences en sel par des microbiologistes tels que Kushner (1987), Larsen (1986), Vreeland (1987), Ramos-Cormenzana (Tang *et al.*, 2003 & Echigo *et al.*, 2005).

Parmi toutes ces méthodes de classification, celle proposée par Kushner est la plus commune (**Tang et al., 2003 & Echigo et al., 2005**).

Les halophiles peuvent être classés approximativement en organismes faiblement halophiles, modérément ou extrêmement halophiles, tout dépend de leur exigence en NaCl (**DasSarma et Arora, 2001 & Abbas, 2006**).

Le tableau ci-dessous résume les différents groupes d'organismes halophiles selon la classification adoptée par Kushner, (1987).

Tableau IV : Types de microorganismes halophiles (par Kushner, 1987) (**Tang et al., 2003**).

Microorganismes	Concentration optimale en NaCl
Non halophiles	< 0,2 mol/L
Faiblement halophiles	0,2 - 0,5 mol/L
Halophiles modérés	0,5 – 2,5 mol/L
Halophiles extrêmes	2,5 – 5,2 mol/L
Halotolérants	Echelle de tolérance 0,2 - 2,5 mol/L

Par ailleurs, les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées mais non obligatoires de sels pour leur croissance (**DasSarma et Arora, 2001 & Lefebvre, 2005**).

L'existence d'actinomycètes halophiles n'a été révélée que vers l'année 1970.

En effet, Gochnauer fut le premier à découvrir une souche d'actinomycète halophile extrême à partir d'une boîte contaminée dans un milieu de culture contenant 25% NaCl et l'avait nommée *Actinopolyspora halophila* (**Tang et al., 2003 & Zhi et al., 2007**).

A l'origine, le genre a été assigné à la famille *Nocardiaceae*.

Depuis 1975, trois espèces ont été identifiées et validées. *Actinopolyspora halophila* (**Gochnauer et al., 1975**), *Actinopolyspora motivallis* (**Yoshida et al., 1991**) et *Actinopolyspora iraqiensis* (**Ruan et al., 1994 & Zhi et al., 2007**).

Ces espèces nécessitent de fortes concentrations en NaCl pour leur croissance et peuvent se développer à des concentrations saturantes en sel. La concentration en NaCl nécessaire à leur croissance dans un milieu liquide est de 12%, et 10% sur milieu solide.

Streptomonospora salina et *Streptomonospora alba*, deux espèces décrites et validées dans le genre *Streptomonospora*, ont été respectivement proposées par **Cui et al.**, (2001) et **Li et al.**, (2003). Leur croissance optimale s'effectue dans des milieux additionnés de sel à des concentrations de 15% (**Zhi et al.**, 2007).

Une nouvelle espèce halophile appartenant au genre *Saccharopolyspora* répondant au nom de *Saccharopolyspora saliphila* a également été décrite et validée et proposée par **Syed et al.**, (2008). Cette espèce présente une croissance optimale en présence de 10% de NaCl.

Parmi les microorganismes halophiles, il existe également une variété d'archées hétérotrophes et méthanogènes, des bactéries photosynthétiques lithotrophes et hétérotrophes ainsi que des eucaryotes photosynthétiques et hétérotrophes.

4.1.3. Ecologie des microorganismes halophiles

Les organismes halophiles sont largement distribués dans les environnements hypersalins de part le monde, dans des saumures naturelles hypersalines en zones arides, côtières et même en mer profonde (**DasSarma et Arora**, 2001 ; **Ghozlan et al.**, 2006 & **Heinrich et al.**, 2007), dans les marais salants et les lacs alcalins hypersalins (**Lefebvre**, 2005 ; **Stan-Lotter et al.**, 2006 & **Xiang et al.**, 2008), certains peuvent même se développer sur des cristaux de sel (**Litchfield et al.**, 2006) et des aliments salés (**Ventosa et al.**, 1998).

Les environnements hypersalins sont généralement définis comme étant des environnements où la concentration en sel est supérieure à celle de l'eau de mer (35%) (**DasSarma et Arora**, 2001).

Il est clair que ces environnements représentent un réservoir de microorganismes spécifiquement adaptés. Les organismes des trois domaines de la vie ont adapté leur croissance aux environnements hautement salins, cependant, plus la concentration de sel augmente plus la diversité des groupes physiologiques diminue (**McGenity et al.**, 2000).

La diversité de ces habitats ou biotopes est représentée dans la figure (6), on trouve des salars en Bolivie et des sécrétions de sel en mer morte en Israël...

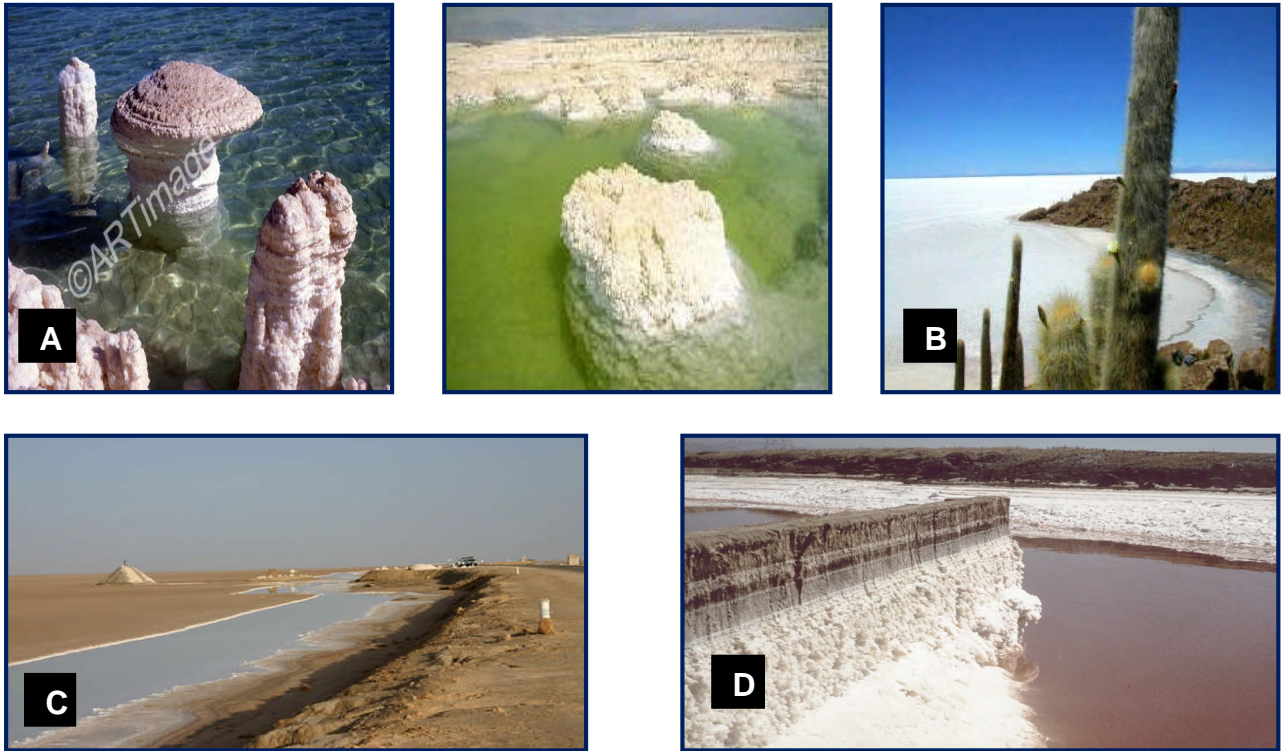


Figure 6 : Aperçu des différents habitats des organismes halophiles.

A : Sécrétion de sel en mer morte, Israël

B : Salar, Bolivie

C : Chott-el-jerid, Tunisie

D : Marais salants près de San Francisco (**DasSarma et Arora, 2001**).

Le tableau (V) présente les différentes espèces d'actinomycètes halophiles modérées isolées, l'origine du site d'isolement ainsi que leur tolérance au sel.

Tableau V : Actinomycètes halophiles modérées isolées de différents environnements salins (Ventosa *et al.*, 2008).

Espèces	Sources d'isolement	Intervalle de [NaCl] et optimum (%)	Référence
<i>Actinopolyspora iraqiensis</i>	Echantillon de sol (Iraq)	5-20 (10-15)	Ruan <i>et al.</i> , (1994)
<i>Actinopolyspora mortivallis</i>	Echantillon de sol, vallée de la mort (USA)	5-30 (10-15)	Yoshida <i>et al.</i> , (1991)
<i>Nocardiopsis baichengensis</i>	Sédiments salins, Province de Xinjiang (China)	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> , (2006)
<i>Nocardiopsis chromatogenes</i>	Sédiments salins, Province de Xinjiang (China)	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> , (2006)
<i>Nocardiopsis gilva</i>	Sédiments salins, Province de Xinjiang (China)	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> , (2006)
<i>Nocardiopsis halophila</i>	Sol salin (Iraq)	3-20 (5-15)	Al-Tai and Ruam, (1994)
<i>Nocardiopsis halotolerans</i>	Salt marsh soil from Kuwait	0-15 (10)	Al-Zarban <i>et al.</i> , (2002a)
<i>Nocardiopsis rhodophaea</i>	Sédiments salins, Province de Xinjiang (China)	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> , (2006)
<i>Nocardiopsis rosea</i>	Sol salin, Province de Xinjiang (China)	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> , (2006)
<i>Nocardiopsis salina</i>	Sol salin, Province de Xinjiang (Chine)	3-20 (10)	Li <i>et al.</i> , (2004a)
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	Sol salin, Province de Xinjiang (Chine)	10	Li <i>et al.</i> ,(2003a)
<i>Saccharomonospora halophila</i>	Marsh soil in Kuwait	10-30 (10)	Al-Zarban <i>et al.</i> , (2002b)
<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	Sol, Province de Xinjiang (Chine)	5-20 (10)	Li <i>et al.</i> , (2003b)
<i>Streptomonospora alba</i>	Sol, Province de Xinjiang (Chine)	5-25 (10-15)	Li <i>et al.</i> ,(2003d)
<i>Streptomonospora salina</i>	Sol, Province de Xinjiang (Chine)	15	Cui <i>et al.</i> , (2001)

4.2. Potentiel biotechnologique des organismes halophiles

Les microorganismes halophiles possèdent des propriétés physiologiques très intéressantes qui facilitent leur exploitation dans le domaine commercial. En effet,

- la plupart de ces microorganismes sont capables de se développer à des concentrations élevées en sel minimisant ainsi les risques de contamination.
- Ils sont facilement cultivables car leurs exigences nutritionnelles sont simples : la majorité sont capables d'assimiler une large gamme de composés comme source de carbone et d'énergie (**Ventosa et al., 1998**).

Ces nouvelles capacités caractéristiques font des organismes halophiles un précieux potentiel biotechnologique (**DasSarma et Arora, 2001**). Les microorganismes halophiles peuvent produire une large variété de produits biotechnologiques tels que : bactériorhodopsine, halorhodopsine, solutés compatibles, biopolymères, biosurfactants, exopolysaccharides, des agents de saveurs, des enzymes hydrolytiques telles que hydrolases, nucléases, amylases, cellulases, protéases, lipases, des agents antitumoraux, et des liposomes (**Birbir et Sesal, 2003**).

D'après l'étude effectuée par **Heinrich et al., (2007)**, l'ectoïne produite par les microorganismes halophiles, appartenant au groupe des solutés compatibles, pour répondre au stress salin, est utilisée en de nombreuses préparations cosmétiques. Cette molécule présente un potentiel immunoprotecteur contre les radiations UV du soleil, car elle permet de prévenir les mutations induites par les UVA sur l'ADN mitochondrial au niveau des fibroblastes dermiques. L'ectoïne joue le rôle d'un produit anti-âge car protégeant la peau des effets nocifs des radiations solaires. (**Heinrich et al., 2007**).

Par ailleurs, les microorganismes halophiles modérés sont utilisés dans le traitement des effluents salins rejetés par les industries comme les industries pharmaceutiques et chimiques etc, grâce à leur capacité à dégrader les composés toxiques. Ainsi un biofilm de bactéries halophiles modérées, isolées à partir du grand lac salé (Utah), a été utilisé dans un but de traitement des eaux usées contenant du phénol (**Ventosa et al., 1998 ; Birbir et Sesal, 2003 & Le Borgne et al., 2008**).

L'espèce *Dietzia maris*, actinomycète d'origine marine est capable de dégrader la paraffine ainsi que d'autres dérivés de pétrole à des concentrations de NaCl supérieures à 10%. L'actinomycète halotolérant *Streptomyces albiacialis* est capable de croître à un taux de salinité supérieur à 30% en utilisant du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie (**Le Borgne et al., 2008**).

D'après **Ventosa et al. (1998)**, les bactéries halophiles modérées possèdent de nombreux autres potentiels, utilisés en biotechnologie qui peuvent être exploités :

- Il a été déclaré que les halophiles modérés pouvaient être utilisés pour l'élimination des phosphates des environnements salins comme alternative aux approches chimiques souvent plus coûteuses ;
- utilisation pour la récupération des déchets hypersalins des saumures dérivant des industries huilières et de cuir.
- Ils peuvent être isolés et criblés pour la production de composés bioactifs tels que les antibiotiques.

4.3. Caractéristiques physiologiques des actinomycètes halophiles

Les actinomycètes sont traditionnellement considérés comme des organismes qui ne sont pas très résistants à l'influence des facteurs environnementaux. Toutefois, d'après l'étude menée par **Zvyagintsev et al.** (2007), il a été déterminé que les caractéristiques spécifiques des complexes actinomycétales des sols salins est la prédominance des *Streptomyces* halophiles, alcalophiles et haloalcalophiles, se développant bien à des valeurs de pH de 8-9 et à des concentrations de NaCl de 5% (**Zvyagintsev et al.**, 2007).

Les actinomycètes se développant à des concentrations modérées en NaCl et isolés à partir de sols salins comptent parmi les bactéries hétérotrophes qui synthétisent des substances compatibles osmorégulatrices (**Zvyagintsev et al.**, 2007). En effet, L'espèce *Actinopolyspora halophila* synthétise des concentrations importantes de betaine, dont la concentration la plus remarquable a été obtenue en présence de 24% de NaCl, qui représentait 33% du poids sec de la cellule (**Nyysola et Leisola**, 2001).

Parmi les actinomycètes halophiles décrites : *Nocardiopsis halophila*, *Nocardiopsis halotolerans*, *N. kunsanensis*, *N. tropica*, *N. trehalosi*, *N. dassonvillei ssp albirubida*, *Streptomonospora salina*, *Prauserella halophila*, *P. alba* et *Actinopolyspora halophila*, elles sont capables de se développer sur un milieu contenant 10-20 et même plus 15-25% de NaCl (**Zvyagintsev et al.**, 2007). Dans les sols salés à très salés, la densité des actinomycètes halophiles et halotolérants est de l'ordre de 10^3 à 10^5 UFC/gss (**Badji**, 2006).

4.4. Les mécanismes d'adaptation à la vie en milieu hypersalin

Récemment, un grand nombre d'extrêmophiles ont été isolés à partir de niches écologiques où leur développement n'était pas attendu (**Echigo et al.**, 2005).

L'intégrité des bactéries halophiles en milieu salin exige le maintien d'un équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu environnant.

Les micro-organismes halophiles ont développé des mécanismes spéciaux afin de s'adapter à l'environnement hypersalin (**Lefebvre, 2005**). En effet, les actinomycètes halophiles possèdent la capacité d'équilibrer la pression osmotique de l'environnement ainsi que résister aux effets dénaturants des sels par la sécrétion d'osmolytes (solutés compatibles) tels que glycine, betaine, ectoine, sucres simples, certains acides aminés, dérivés d'acides aminés et autres (**Rainey et Oren, 2006**).

Les composés ont été nommés solutés compatibles en raison de leur compatibilité avec le métabolisme cellulaire à des concentrations élevées en sel (**Nyysola et Leisola, 2001 & Romeo et al., 2001**).

Les solutés compatibles, plus spécialement, la glycine, la bétaine et l'ectoine peuvent agir comme agents protecteurs contre le stress, stabilisateurs d'enzymes, d'acides nucléiques ainsi que des parois cellulaires (**Ventosa et al., 1998 ; Kundu et al., 2008 & Ventosa et al., 2008**).

4.4.1. Régulation de la pression osmotique

A faible concentration, le sel (NaCl) est indispensable au fonctionnement cellulaire, mais à forte dose, il entraîne la mort cellulaire par sortie d'eau due à la perméabilité membranaire (**Lefebvre, 2005 & Saum et Muller, 2007**).

La propriété de base de tous les microorganismes halophiles est le fait que leur cytoplasme est iso osmotique avec les milieux environnants (**Oren, 2008**).

Il existe deux stratégies fondamentales différentes utilisées par les microorganismes halophiles afin d'équilibrer la pression osmotique de leur cytoplasme avec leur milieu.

- ❖ La première permet l'accumulation de concentrations molaires de KCl. Cette stratégie nécessite l'adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire, telles que les protéines qui doivent maintenir leur conformation propre ainsi que leur activité à des concentrations saturantes en sel.

Le protéome de tels organismes est hautement acide et la plupart des protéines se dénaturent lorsqu'elles sont en suspension dans des concentrations faibles en sel.

De tels microorganismes sont généralement incapables de survivre dans des milieux de culture à faible concentration en NaCl (**Saum et Muller, 2007 et Oren, 2008**).

Cette stratégie d'adaptation « *salt-in* » est rencontrée chez les archaea halophiles extrêmes de la famille *Halobacteriaceae* mais également chez quelques groupes bactériens (**Rainey et Oren, 2006**).

- ❖ La seconde stratégie est l'exclusion du sel à partir du cytoplasme et/ou de l'accumulation de solutés compatibles organiques qui n'interfèrent pas avec l'activité enzymatique (**Ventosa et al., 1998 ; Saum et Muller, 2007 & Oren, 2008**).

Toutefois, la seconde stratégie est la plus largement rencontrée dans la nature, basée sur la biosynthèse et /ou l'accumulation de solutés compatibles organiques, et peut être rencontrée dans les trois domaines de la vie (**Rainey et Oren, 2006 ; Saum et Muller, 2007 & Oren, 2008**).

Le nombre de solutés compatibles organiques dont leur utilisation en tant que solutés osmotiques a été démontrée chez les microorganismes halophiles ; aussi bien procaryotes qu'eucaryotes est très important (**Oren, 2008**).

La plupart de ces composés sont des sucres et polyols tels que le tréhalose et le glycérol, des acides aminés tels que le glutamate et la proline et des dérivés d'acides aminés tels que la bétaine et l'ectoïne (**Robert et al., 2000**).

Ces osmolytes peuvent être soit synthétisés par la cellule ou bien transportés du milieu vers la cellule (**Canovas et al., 1998 ; Ventosa et al., 1998 ; DasSarma et Arora, 2001 & Roberts, 2005**). Leurs accumulations aide à maintenir la pression, le volume cellulaire ainsi que la concentration des électrolytes ; tous, des éléments importants pour le développement cellulaire (**Roberts, 2005**). En plus de leurs fonctions comme substances osmotiquement actives, les solutés compatibles peuvent jouer le rôle de chaperons protégeant ainsi les protéines de la dénaturation. (**Torsvik et Øvreås, 2008**).

Les osmolytes organiques sont classés en général en trois catégories chimiques :

- (i) **Solutés zwitterions** : tels que : la bétaine, l'ectoïne et l'hydroxyectoïne, dont les espèces d'actinomycètes productrices : Halotolérantes : *Actinopolyspora sp*, et Halophiles: *Actinopolyspora. halophila* et *Nocardiopsis. halophila* (**Nyysola et Leisola, 2001 et Roberts, 2005**).
- (ii) **Solutés non chargés** : tels que les hydrates de carbone : α -glucosylglycerol et tréhalose.
Le tréhalose est un soluté compatible rencontré chez l'espèce actinomycetale *Actinopolyspora halophila* qui peut atteindre une concentration supérieure à 9,7% du poids sec (**Roberts, 2006**).

(iii) **Solutés anioniques** : tels que : β -glutamate et β -Hydroxybutyrate.

Le β -glutamate est rencontré chez l'espèce halophile *Nocardiopsis halophila* (Roberts, 2005)

4.4.2. Adaptation des protéines à l'hypersalinité

La présence de concentrations molaires en sels est généralement préjudiciable aux protéines et aux autres macromolécules. Cela cause des agrégations et des effondrements de la structure tertiaire à cause de l'augmentation des interactions hydrophobes, qui interfèrent avec des interactions électrostatiques intra ou inter macromoléculaires dues aux charges, mais également à cause de l'hydratation des ions de sel qui réduisent la disponibilité des molécules d'eau libres en dessous du taux requis au maintien des processus biologiques essentiels (Oren, 2008).

Deux stratégies peuvent être utilisées pour répondre à ce type de stress :

- **Stratégie du « Salt in »**

En accumulant dans leur cytoplasme des quantités de sel proche de la saturation, les bactéries halophiles empêchent la sortie d'eau mais se soumettent à un nouveau type de stress cellulaire : le stress salin. Avec de telles concentrations, des protéines « normales » deviennent insolubles et précipitent (Lefebvre, 2005).

Or les organismes halophiles ne semblent pas connaître ce stress cellulaire : leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles à de fortes concentrations en KCl, mais elles se dénaturent lorsque la concentration en sel diminue (Rainey et Oren, 2006). L'analyse des concentrations ioniques intracellulaires, chez différentes espèces d'archaea halophiles, montre que ces microorganismes maintiennent leur milieu intracellulaire à des concentrations relativement élevées en sel (Oren, 2006).

Pour ce faire, les protéines « halophiles » concentrent fortement le sel près de leur surface et utilisent ses capacités hygroscopiques pour capturer les molécules d'eau nécessaires à leur repliement, leur stabilisation et leur solubilité. Ce phénomène est rendu possible par une abondance d'acides aminés « acides » tels que les acides glutamique et aspartique, connus pour interagir fortement avec les molécules d'eau et les cations tels que K^+ (Lefebvre, 2005 & Ventosa *et al.*, 2008), comparativement aux protéines des bactéries non halophiles qui sont chimiquement neutres (Oren, 2008 et DasSarma, 2006).

- **Stratégie du « low salt in »**

La seconde stratégie est rencontrée chez la plupart des bactéries halophiles, elle implique la maintenance d'une concentration en sel plus faible que celle du milieu extracellulaire (**Oren, 2008**) et l'accumulation ou la production de solutés compatibles.

Cette accumulation est une réponse secondaire faisant suite à une réponse primaire à un choc hyperosmotique, cette dernière consiste en l'accumulation d'ions K^+ empêchant la plasmolyse et conduisant à la restauration de la pression de turgescence en préservant l'équilibre osmotique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique (**Empadinhas et da Costa, 2006**), c'est une réponse à court terme et survenant dès qu'il y a modification de l'osmolarité extracellulaire.

La réponse secondaire qui consiste en l'accumulation de solutés compatibles est une réponse à long terme, car ces osmoprotecteurs peuvent être accumulés à de très fortes concentrations dans le cytoplasme des cellules exposées au stress osmotique (**Elmnasser et al., 2006**).

Les solutés compatibles protègent et stabilisent les protéines en étant exclues de leur surfaces (**Csonka et Epstein, 1995 & Oren, 2002**).

La figure (7) illustre l'action des solutés compatibles sur la stabilité d'une protéine.

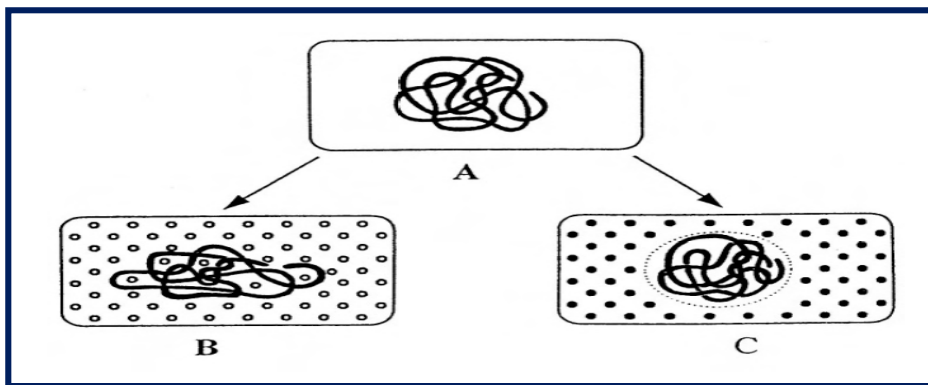


Figure 7 : Représentation schématique de l'effet des solutés compatibles sur la conformation et la stabilité d'une protéine (**Oren, 2002**).

(A) : Protéine hypothétique dans sa conformation native ; (B) : Forme dénaturée de la protéine dans un environnement dénaturant tels que l'urée ; (C) : Protéine stabilisée en présence de solutés compatibles qui sont préférentiellement exclus de l'interface de la protéine.

CHAPITRE II : METABOLISME SECONDAIRE DES ACTINOMYCETES

1. Cycle de développement des actinomycètes

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

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique.

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

Sur un milieu solide, les sporoactinomycètes produisent un ou plusieurs mycéliums de substrats (MS), ramifié et non fragmenté, suite à la germination d'une spore et se développent par croissance apicale (figure 8) (**Theilleux, 1993 et Horinouchi, 2002**).

La longueur des filaments mycéliens varie de 0,5 à 2 μm . Leur ramification est très souvent monopodiale mais parfois dichotomique ou verticillée (**Theilleux, 1993**).

En réponse à certains signaux, le mycélium aérien émerge par la réutilisation de composés assimilés par le mycélium végétatif tels que l'ADN, les protéines ainsi que des composés stockés résultants de la lyse du MS (**Horinouchi, 2002 et Ou *et al.*, 2008**). Les hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat. Ils sont en général pigmentés (**Theilleux, 1993**).

Lorsque la croissance du mycélium aérien s'arrête, contrairement au mycélium végétatif, des septas sont formés à des intervalles réguliers le long de l'hyphe formant des compartiments unigenomiques. Les septas de sporulation consistent en deux membranes séparées par une double couche de matériel cellulaire qui permettra une éventuelle séparation des spores adjacentes.

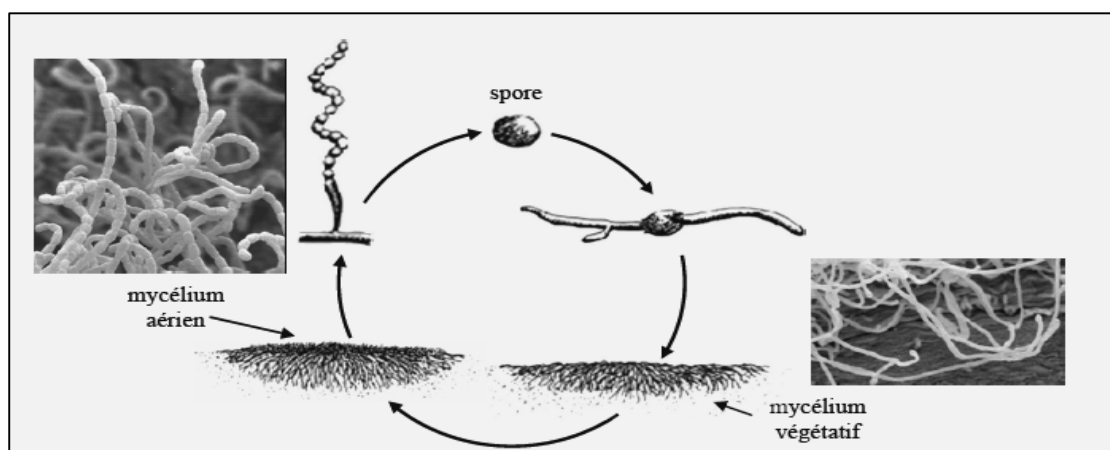


Figure 8 : Cycle de différenciation chez le genre *Streptomyces* (**Choulet, 2006**).

2. Métabolisme général

Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs (**Theilleux, 1993 & Zhang et Zeng, 2007**). En effet, la streptomycine fut le premier antibiotique ayant pour origine une souche de *Streptomyces*. Dès lors, les streptomycètes ont prouvé qu'ils représentaient la plus importante source de molécules de faible poids moléculaire (taille : 250 Da) (**Schrempf, 2006**). D'après **Tarkka et Hampp (2008)**, les métabolites secondaires des Streptomycètes peuvent être séparés en quatre classes distinctes en fonction de leur activité biologique :

- 1- Agents antagonistes, comportant des antibiotiques, des antifongiques, des antiprotozoaires et même des antiviraux.
- 2- Agents pharmacologiques tels que des antitumoraux et des inhibiteurs d'enzymes ;
- 3- Agents agrobiologiques tels que des pesticides et des herbicides ;
- 4- Composés à activité régulatrice, tels que des facteurs de croissance.

Ces propriétés traduisent la richesse tout à fait remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien (**Theilleux, 1993**).

La diversité métabolique de la famille des *Actinomycetaceae* est due à leur génome de grande taille qui renferme des centaines de facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes, leur permettant de répondre à des besoins spécifiques (**Singh et al., 2006**).

2.1. Le métabolisme primaire

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

2.2. Le métabolisme secondaire

La première définition du métabolisme secondaire date de 1891 et désignait les transformations aboutissant aux composés relativement peu importants de la physiologie végétale (**Ginolhac, 2006**). Le métabolisme secondaire se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (**Theilleux, 1993 ; Challis et Hopwood, 2003 & Ginolhac, 2006**). De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas de fonctions apparentes dans le métabolisme cellulaire (**Colombié, 2005**).

Plusieurs hypothèses ont jusque là été formulées pour expliquer le rôle du métabolisme secondaire.

- D'après von Döhren et Gräfe, (1997) cités par **Ginolhac** (2006), une première hypothèse s'appuie sur l'observation que les microorganismes qui produisent un grand nombre de métabolites secondaires (*Actinomycetales*, champignons) possèdent des cycles de vie comprenant de multiples formes et différentes phases. Ainsi, ces métabolites pourraient agir comme des signaux intracellulaires et morphogéniques. Dans le cas des *Actinomycetales*, leur cycle de vie complexe comprend des phases successives de sporulation et de croissance végétative. Pour exemple, les métabolites secondaires, dont certains antibiotiques, sont produits au cours du développement du mycélium aérien lors de la croissance sur milieu solide. La synthèse de ces produits est donc intimement liée au cycle de développement des organismes.

- Une autre hypothèse suggère que le métabolisme secondaire servirait à maintenir en fonctionnement le métabolisme primaire lorsque celui-ci est moins sollicité pour les besoins de la cellule. C'est d'ailleurs au cours de la phase stationnaire que les métabolites secondaires sont, en général, produits (**Horinouchi, 2002 et Ginolhac, 2006**).

Le métabolisme secondaire intègre la production des antibiotiques et des molécules permettant un meilleur accès aux nutriments comme les sidérophores, connus pour présenter une activité antibiotique (**Wang *et al.*, 1999 & Challis et Hopwood, 2003**).

Malgré la diversité de leurs structures chimiques et de leurs activités biologiques, les métabolites secondaires sont synthétisés à partir d'un petit nombre de précurseurs directement issu du métabolisme primaire (**Theilleux, 1993 et Mellouli *et al.*, 2004**).

Le métabolisme secondaire des actinomycètes est affecté par la nature et les taux des sources de carbone et d'azote ainsi que par la disponibilité du phosphore (**Ou *et al.*, 2008 & Tarkka et Hampp, 2008**) et de molécules diffusibles telles que le γ -butyrolactone (**Nedal, 2007**).

La biosynthèse des métabolites secondaires est régulée par divers mécanismes dont la répression par les sources nutritionnelles, l'induction, la répression ou l'inhibition d'enzyme des voies de biosynthèse par le métabolite final (**Theilleux, 1993**).

Outre la production d'antibiotiques, les actinomycètes produisent un grand nombre de métabolites secondaires à activités variées (fig 9).

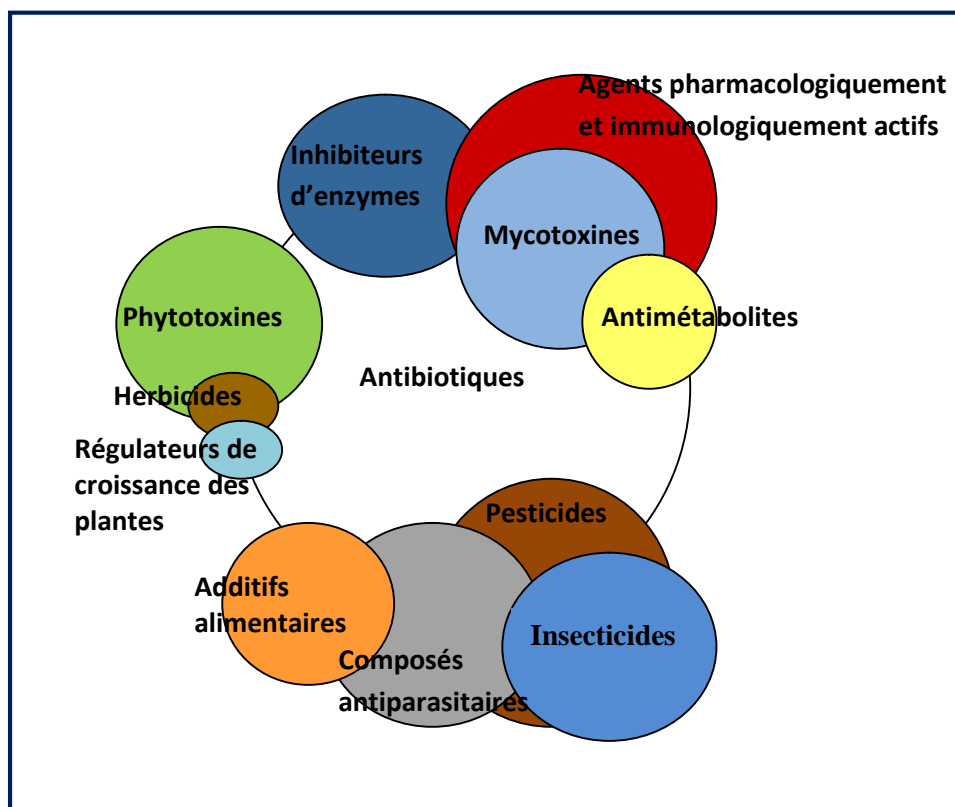


Figure 9: Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (Conn, 2005).

2.2.1. Les différentes familles d'antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire (Coates et Hu, 2007).

Ils exercent un effet majeur sur la santé, la nutrition et l'économie de la société.

Sur 8100 molécules qui ont été recensées vers la fin de l'année 1999, 45,6% ont été produits par le genre *Streptomyces*, 16,0% par des actinomycètes autres que *Streptomyces*, 16,9% par d'autres bactéries et 21,5% par des champignons (Demain et Lancini, 2006).

En plus du nombre important de ces molécules, un autre aspect impressionnant des antibiotiques est la diversité de leurs structures chimiques. En effet, toutes les classes de la chimie organique y sont représentées : des chaînes aliphatiques, des cycles aromatiques isolés ou condensés, des hétérocycles et des oligopeptides, des oligosaccharides ... etc, (Demain et Lancini, 2006).

Les antibiotiques sont communément classés en familles en fonction de leurs structures chimiques. Une famille renferme toutes les molécules ayant une structure chimique similaire et partageant le même mode d'action antimicrobien. Ce qui suit est un aperçu des familles d'antibiotiques classiques utilisées en thérapie humaine avec des exemples d'espèces d'actinomycètes productrices.

2.2.1.1. Les β -Lactames

La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame indispensable à l'activité antibiotique (**Cavallo et al., 2004**).

Les β -lactamines sont des molécules cycliques qui interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane (**Cavallo et al., 2004**).

Ils exercent une action bactéricide sur de nombreuses espèces bactériennes.

La thienamycine connu sous le nom de imipeneme, l'un des derniers antibiotiques découvert possédant un cycle lactame et doté d'un large spectre d'action, est produit par l'espèce actinomycetale *Streptomyces cattleya* (**Demain et Lancini, 2006**).

2.2.1.2. Les Aminoglycosides

Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol (**Yala et al., 2001**).

Ce sont des molécules très actives sur les bactéries Gram négatif et agissent en inhibant la synthèse protéique de façon irréversible au niveau de la fraction 30S du ribosome (**Yala et al., 2001**).

L'antibiotique le plus connu est la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* et la gentamycine produite par *Micromonospora purpurea* (**Demain et Lancini, 2006**).

2.2.1.3. Les Tétracyclines

La famille des tétracyclines est constituée par quatre cycles arrangés linéairement, leur large spectre d'action agit en inhibant la synthèse protéique au niveau de la petite sous unité ribosomique 30S (**Yala et al., 2001 ; Demain et Lancini, 2006**).

L'oxytétracycline est utilisée cliniquement, elle est produite par l'espèce *Streptomyces rimosus*, la tétracycline et la chlortétracycline sont synthétisées par *Streptomyces aureofaciens* (**Demain et Lancini, 2006**).

2.2.1.4. Les macrolides

- *Les macrolides antibactériens*

C'est une grande famille de produits caractérisés par des cycles lactone de 12 à 16 atomes (**Alekseyevna Borisova, 2004**) contenant deux ou plusieurs constituants glucidiques. L'antibiotique le plus représentatif de cette famille est l'érythromycine produite par l'espèce *Saccharopolyspora erythrea* (**Demain et Lancini, 2006**).

Cette famille permet l'inhibition de la synthèse protéique en se liant à la sous unité ribosomique 50S (Alekseyevna Borisova, 2004 et Demain et Lancini, 2006). Ils sont bactériostatiques.

- *Les polyènes*

Les antifongiques de la famille des macrolides différent des macrolides bactériens dans la taille du cycle lactone, comprenant 26 à 38 atomes d'une part ainsi que par la présence d'une série de doubles liaisons conjuguées d'autre part. Le composé polyénique le plus utilisé est l'amphotéricine B produite par *Streptomyces nodosus*. L'activité antifongique est due à l'interférence avec des stérols membranaires, provoquant une altération de la perméabilité membranaire (Demain et Lancini, 2006).

2.2.1.5. *Les Glycopeptides*

Parmi le nombre important d'antibiotiques que renferme cette famille, les plus connus sont la vancomycine et la teicoplanine, produites par *Amycolatopsis orientalis* et *Actinoplanes teichomyceticus*, respectivement (Demain et Lancini, 2006).

Ces deux molécules n'agissent que sur les bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse du peptidoglycane donc de la croissance bactérienne (Yala *et al.*, 2001).

2.2.1.6. *Les rifamycines*

Les rifamycines sont constituées d'un macrocycle et d'un cycle aromatique (Yala *et al.*, 2001).

Leur mécanisme d'action est l'inhibition de la synthèse de l'ARN en se liant à l'ARN polymérase. Les molécules produites industriellement sont la rifamycine B et la rifamycine SV, à partir de l'espèce *Amycolatopsis mediterranei* (Demain et Lancini, 2006).

Il existe des antibiotiques importants n'appartenant à aucune des grandes familles citées, notamment le chloramphenicol et la lincomycine, les deux molécules possèdent un mécanisme d'action similaire à celui de l'erythromycine. Le chloromphenicol a été isolé à partir de l'espèce *Streptomyces venezuelae* mais synthétisé actuellement par voie chimique. La lincomycine est synthétisée par l'espèce *Streptomyces lincolnensis* (Demain et Lancini, 2006).

Cependant, depuis 20 ans la découverte de nouveaux composés ne fait que diminuer. L'âge d'or de la découverte d'antibiotiques n'aura duré que 20 ans dans le siècle qui a vu naître cette discipline puisque seules deux nouvelles classes d'antibiotiques ont été découvertes depuis 1969, les linézolidés (oxazolidinones) et les daptomycines (lipopeptides) (Coates et Hu, 2007).

Le faible taux de découverte de nouveaux produits est rendu d'autant plus critique que les résistances aux antibiotiques se multiplient (**Ginolhac, 2006 et Narayana et al., 2008**).

Au vaste ensemble des antibiotiques, d'autres applications industrielles viennent s'ajouter, comme la production d'enzymes (**Theilleux, 1993**).

2.2.2. Les enzymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (**Theilleux, 1993**). En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases (**Tanaka et Omura, 1990 & Vonothini et al., 2008**), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (**Park et al., 2002**).

A titre d'exemple : la D-xylose isomérase, plus connue sous le nom de glucose isomérase, produite par l'espèce *Actinoplanes missouriensis* et plusieurs espèces de *Streptomyces*, est utilisée pour obtenir des sirops riches en D-fructose.

Un complexe amyliase issu de *Streptomyces hydroscopicus* et *S. praecox* a été exploité pour préparer des sirops riches en maltose.

Les protéases d'actinomycètes sous forme libre ou immobilisées sont employées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, en tannerie et comme additifs dans les détergents (ex : pronase de *S. griseus*) (**Theilleux, 1993**).

Par ailleurs, les actinomycètes produisent de fortes quantités de chitinases et de β -1-3-glucanase et causent des plasmolyses et des lyses des parois cellulaires des pathogènes

(**Conn, 2005**). D'après **Park et al. (2002)**, les chitinases produites et sécrétées par les actinomycètes agissent sur les cuticules des nématodes adultes et provoquent ainsi leur mort.

Notamment l'espèce *Streptomyces coelicolor* qui sécrète de nombreuses hydrolases incluant : 60 protéases/peptidases, 13 chitinases/chitosanases, 8 cellulases/endoglucanases, 3 amylases et 2 pectates lyases (**Bentley et al., 2002**).

2.3. Métabolites secondaire produits par les actinomycètes halophiles.

Des actinomycètes d'origine marine ont prouvé leur capacité à produire des métabolites secondaires présentant des activités biologiques très variées aussi variées que des agents antifongiques, antitumoraux, antibactériens, immunosuppresseurs, insecticide, et des inhibiteurs d'enzymes. Le genre *Salinispora*, produit à lui seul, une grande variété de métabolites possédant différentes activités biologiques (**Solanki et al, 2008**).

2.3.1. Les antibiotiques

Les actinomycètes d'origine marine constituent une importante source de nouveaux composés bioactifs. Un grand nombre de molécules antibiotiques ont été isolées à partir de ces microorganismes (Sivakumar *et al.*, 2007 et Das *et al.*, 2008).

Les composés bioactifs originaires des actinomycètes marins possèdent des structures chimiques distinctes (Bredholt *et al.*, 2008 ; Solanki *et al.*, 2008 & Tarkka *et al.*, 2008). Quelques exemples particulièrement intéressants sont représentés dans la figure (10) :

- **l'abyssomicine C**, produit par une souche marine du genre *Verrucosispora*, capable d'inhiber la croissance des bactéries à Gram positif, incluant des bactéries multi résistantes (ex : *S. aureus* vancomycine résistant).
- **la diazepinomicine** qui est un métabolite produit par une souche du genre *Micromonospora* et possède une activité antibactérienne, anti-inflammatoire et antitumorale.
- **Le salinosporamide A**, isolés à partir d'un bouillon de fermentation de l'espèce marine obligatoire *Salinispora tropica*, souche isolée en 1991 par Jensen et Fenical des sédiments collectés au Bahamas qui est un agent anticancéreux (Mahyudin, 2008 et Williams, 2008).

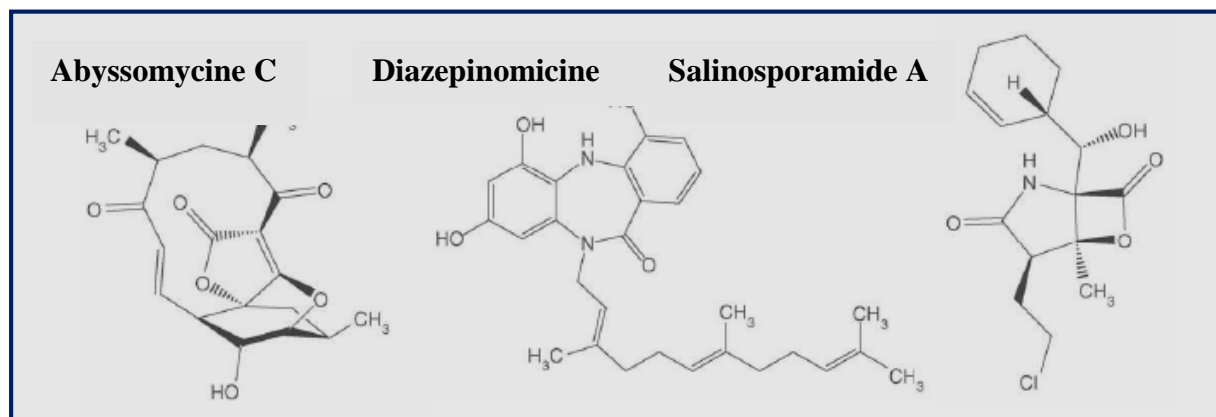


Figure 10 : Exemples de composés bioactifs produits par des actinomycètes halophiles (Mahyudin, 2008).

2.3.2. Les enzymes

D'après Sivakumar *et al.* (2007), les actinomycètes d'origine marine présentent des activités enzymatiques très variées (lipolytiques, chitinolytiques, amlyolytiques, cellulolytiques et protéolytiques), de plus ce groupe microbien contribue significativement à la dégradation et au recyclage de composés organiques.

Les inhibiteurs d'enzymes ont également reçu une attention toute particulière pour leur utilisation potentielle en pharmacologie. **Sivakumar et al.** (2007), ont rapporté que Imad, (2005) a mis en évidence de nombreux types d'inhibiteurs d'enzymes tels que ceux de la β -glucosidase et de l' α -amylase.

3- Les microorganismes producteurs d'antibiotiques.

Comme l'ont souligné Chater et Merrick en 1979, cités par **Challis et Hopwood, (2003)**, les antibiotiques produits par l'ordre des actinomycetales le sont généralement en petites quantités à la phase de transition entre le développement végétatif où la croissance se ralentit, en raison de l'épuisement des éléments nutritifs du milieu et le développement du mycélium aérien.

En effet, les microorganismes concurrents pourraient être attirés par des acides aminés, des sucres, et d'autres petites molécules découlant de la dégradation du mycélium végétatif, ces antibiotiques se proposent de défendre cette source de nutriments (**Challis et Hopwood, 2003**). Ce sont des médiateurs intercellulaires (populations) permettant la communication de ces organismes dans leur habitat (**Danilenko et al, 2005**).

Le tableau (VI) donne un aperçu sur l'histoire des classes d'antibiotiques ainsi que l'origine de l'organisme producteur.

Tableau VI: Classes d'antibiotiques en usage clinique et origine de l'organisme producteur (Ginolhac, 2006).

Année	Antibiotique (AB)/Antitumoral (AT)	Classe	Produit	Origine
1929	pénicilline (AB) (activité)	β -lactame	naturel	champignon
1940	pénicilline (purification)		naturel	
1932	sulfapyridine (AB)	sulfonamide	synthétique #	
1944	streptomycine (AB)	aminoglycoside	naturel	actinomycetales
1945	céphalosporine (AB)	β -lactame	naturel	champignon
1947	chloramphénicol (AB)	phenylpropanoïde	naturel	actinomycetales
1948	chlortétracycline (AB)	tétracycline	naturel	actinomycetales
1950	érythromycine (AB)	macrolide	naturel	actinomycetales
1953	mithramycine (AT)	anthracycline	naturel	actinomycetales
1955	vancomycine (AB)	glycopeptide	naturel	actinomycetales
1955	virginiamycine (AB)	streptogramine	naturel	actinomycetales
1955	amphotéricine (AB)	polyène	naturel	actinomycetales
1955	lincomycine (AB)	lincosamide	naturel	actinomycetales
1957	actinomycin D (AT)	depsipeptide	naturel	actinomycetales
1959	rifamycine (AB)	ansamycine	naturel	actinomycetales
1959	streptozocine (AT)	aminoglycoside	naturel	actinomycetales
1962	acide nalidixique (AB)	quinolone	synthétique #	
1964	daunorubicine (AT)	anthracycline	naturel	actinomycetales
1964	mitomycine C (AT)	benzoquinone	naturel	actinomycetales
1969	fosfomycine (AB)	phosphonate	naturel	actinomycetales
1969	doxorubicine (AT)	anthracycline	naturel	actinomycetales
1974	pentostatine (AT)	nucléoside	naturel	actinomycetales
1975	bléomycine (AT)	glycopeptide	naturel	actinomycetales
2000	linézolide (AB)	oxazolidinone	synthétique #	
2003	daptomycine (AB)	lipopeptide	naturel	actinomycetales

La figure 11 illustre la production d'antibiotiques par une colonie d'actinomycète du genre *Streptomyces*.

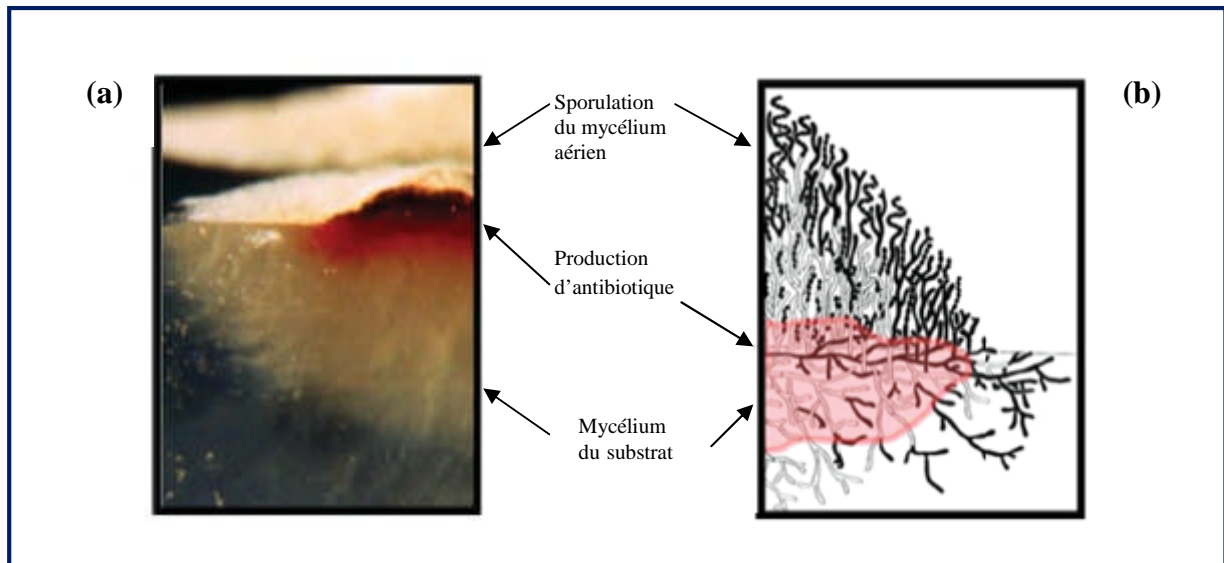


Figure 11 : Section verticale d'une colonie de *Streptomyces*.

(a) : Photographie d'une colonie se développant sur milieu solide ; (b) : Diagramme indiquant la production d'antibiotique dans la partie basse de la colonie, protégeant ainsi les nutriments libérés dans le milieu par les cellules mortes (en gris) pour permettre la croissance du mycélium aérien et de la sporulation (cellules vivantes en noir) (Chater, 2006).

La relation étroite entre les différenciations morphologique et physiologique est bien connue à travers des observations empiriques, où la perte spontanée de la production de certains antibiotiques est fréquemment accompagnée par la perte de sporulation chez certaines espèces de *Streptomyces* (Horinouchi, 2002).

PARTIE II

MATERIELS
ET METHODES

Partie II : Matériels et Méthodes

I. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens

1. Origine et prélèvement des échantillons et caractérisation physico-chimiques du sol

1.1. Origine et prélèvement des échantillons

L'isolement des souches a été réalisé à partir d'échantillons de sol au voisinage d'une source d'eau saline située dans la région d'Iadnanen commune de Feraoun (à 45 km au Sud Ouest du chef lieu de la wilaya de Béjaia), cette région est connue pour sa richesse en sols salins ; d'ailleurs, les habitants continuent d'exploiter et d'extraire le sel de manière traditionnelle dans des cuvettes aménagées pour la circonstance. Le sol est de couleur noire et très humide. Le taux de salinité, à première vue, est important se traduisant par la formation de cristaux de sel à la surface des plans d'eau saturés. Les photographies (12, 13 et 14) en page 43 montrent une vue générale du site. Le prélèvement des échantillons a été effectué dans des conditions d'asepsie rigoureuses à proximité d'une flamme et jusqu'à 20 cm de profondeur et cela en utilisant un dispositif tubulaire stérile. Nous avons éliminé les 3 premiers centimètres en surface.

Les lots d'échantillons étaient au nombre de 11 (trois unités de prélèvement pour chaque échantillon) ont été codés de manière à faciliter le repérage des lieux ultérieurement.

Le transport vers le laboratoire a été effectué à température ambiante.

Les prélèvements ont été réalisés durant le mois d'Avril 2008.



Figure 12 : Source d'eau salée : Iadnannen



Figure 13 : cristaux de sel à la surface du sol au voisinage de la source



Figure 14 : Vue d'ensemble du site de prélèvement : Iadnannen (commune de Feraoun)

1.2. Caractérisation physicochimique du sol

Les analyses physicochimiques du sol ont été effectuées au niveau du laboratoire de Biologie des sols (pédologie) de l'université Abderrahmane Mira de Béjaia (UAMB).

Les tests menés sur les caractéristiques physicochimiques et granulométriques du sol sont plus destinés à connaître les conditions de croissance ainsi que l'environnement dans lesquels évoluent les espèces d'actinomycètes.

L'échantillon de sol est séché à l'air libre pendant 4 jours puis tamisé à l'aide de tamis de différents diamètres afin d'étudier ses caractéristiques pédologiques.

Les tests effectués étant :

- L'analyse granulométrique
- Le dosage de la matière organique du sol
- La détermination de la teneur en carbonate du sol
- Le dosage du calcaire total
- Le dosage du calcaire actif
- Mesure de la concentration en sel

Le détail des analyses citées ci-haut est donné en annexe. N° (1)

2. Méthodes d'isolement

Les isolats ont été obtenus à partir des échantillons de sol par la méthode des suspensions dilutions (**Badji et al., 2005**) .

10 grammes de sol sont mis en suspension dans 100 ml d'eau physiologique stérile puis des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à 10^{-5} . Un volume de 0,1 ml (100 μ l) de chaque dilution est étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu d'isolement. (à raison de 3 essais/ dilution). Les boîtesensemencées sont incubées à 28°C et la lecture est faite quotidiennement à partir du 3^{ème} jour.

2.1. Milieu de culture utilisé

Le milieu utilisé est celui de Williams modifié préconisé pour l'isolement sélectif des actinomycètes comme rapporté par **Boughachiche et al.** (2005) ; selon ces auteurs, il s'est avéré être efficace en permettant une bonne récupération des actinomycètes à partir des milieux naturels. Cet avantage est expliqué par la présence dans ce milieu d'amidon et de caséine qui stimulent la croissance des actinomycètes.

Le milieu Williams a été additionné de 7,5% de NaCl pour l'isolement sélectif des actinomycètes modérément halophiles ainsi que d'un antifongique, le cycloheximide, à raison de 50 μ g/ml afin d'inhiber le développement des champignons.

La composition de ce milieu (modifié) est donnée en annexe N°(2).

2.2. Purification et conservation des souches

Les souches d'actinomycètes isolées ont été purifiées en utilisant le milieu Williams à 7,5 % de NaCl exempt d'antifongique.

Les isolats purifiés ont été conservés à 4°C sur le même milieu en vue d'études ultérieures.

Par ailleurs, 35 souches au total, appartenant à la collection du Laboratoire de Biochimie Microbienne (LBM) isolées en Avril 2007, par le Dr Kecha, purifiées et conservées à 4°C sur le même milieu à deux concentrations en NaCl (5% et 7,5%) ont fait l'objet d'un réisolement en vue de confirmer leur aptitude à produire des substances antibiotiques.

II. Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes

1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide

Matériel biologique

❖ Microorganismes cibles

Dans le but d'effectuer un criblage préliminaire, les isolats conservés sont testés pour leurs activités antibiotiques vis-à-vis des microorganismes cibles suivants :

NB : entre parenthèses nous indiquons la provenance des souches.

• Bactéries à Gram positif

-*Staphylococcus aureus* ; ATCC 6538 (SAIDAL- Antibiotical)

-*Micrococcus luteus* ; ATCC 9314 (ENS-Kouba)

-*Bacillus subtilis* ; ATCC 6633 (SAIDAL Antibiotical)

• Bactéries à Gram négatif

-*Escherichia coli* ; Nalidixic Acid Resistant (NAR) (LMA)

-*Klebsiella pneumoniae* ; E47 (LMA)

-*Pseudomonas aeruginosa* ; ATCC 27853 (Institut Pasteur)

• Levure

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

• Moisissures

Aspergillus niger : 939N (ENS-Kouba)

Mucor rammanianus : NRRL 1829

Fusarium polyferatum

❖ Standardisation de l'inoculum

La méthode de standardisation des germes cibles utilisée est celle des suspensions dilutions ; accompagnée d'une mesure de la densité optique, à différentes longueurs d'onde suivant le germe étudié, (DO = 0,5) de la solution mère sur un spectrophotomètre (Shimadzu UVmini. 1240) suivie par un dénombrement sur boîte pour les bactéries et sur cellule de Malassez pour les champignons (suspensions de spores). La charge de l'inoculum utilisé est de 10^7 UFC/ml pour les bactéries (Billerbeck *et al.*, 2002) et *C. albicans* et de 10^7 spores /ml pour les champignons filamenteux. (Matan and Matan, 2008).

L'activité antimicrobienne des souches a été évaluée par deux méthodes :

1.1. Technique des stries croisées (Rothrock et Gottlieb, 1981)

L'activité antimicrobienne des isolats est évaluée par la méthode des stries croisées sur milieu Williams modifié. Celle-ci consiste à ensemencer les souches à tester en un seul trait à la surface du milieu solide en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation pendant 10 jours à 28°C, les souches cibles sont ensemencées perpendiculairement à la strie longitudinale de la souche d'actinomycète (figure 15).

Les boîtes sont incubées à 37°C de 24h à 48h pour les bactéries et la levure et à 28°C/48h à pour les moisissures.

La lecture des résultats s'effectue en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures de la souche cible et de la souche test (actinomycète).

Il demeure évident que la croissance des germes cibles sur Williams à 5% et à 7,5% de NaCl a été préalablement vérifiée afin d'éviter de faux résultats positifs.

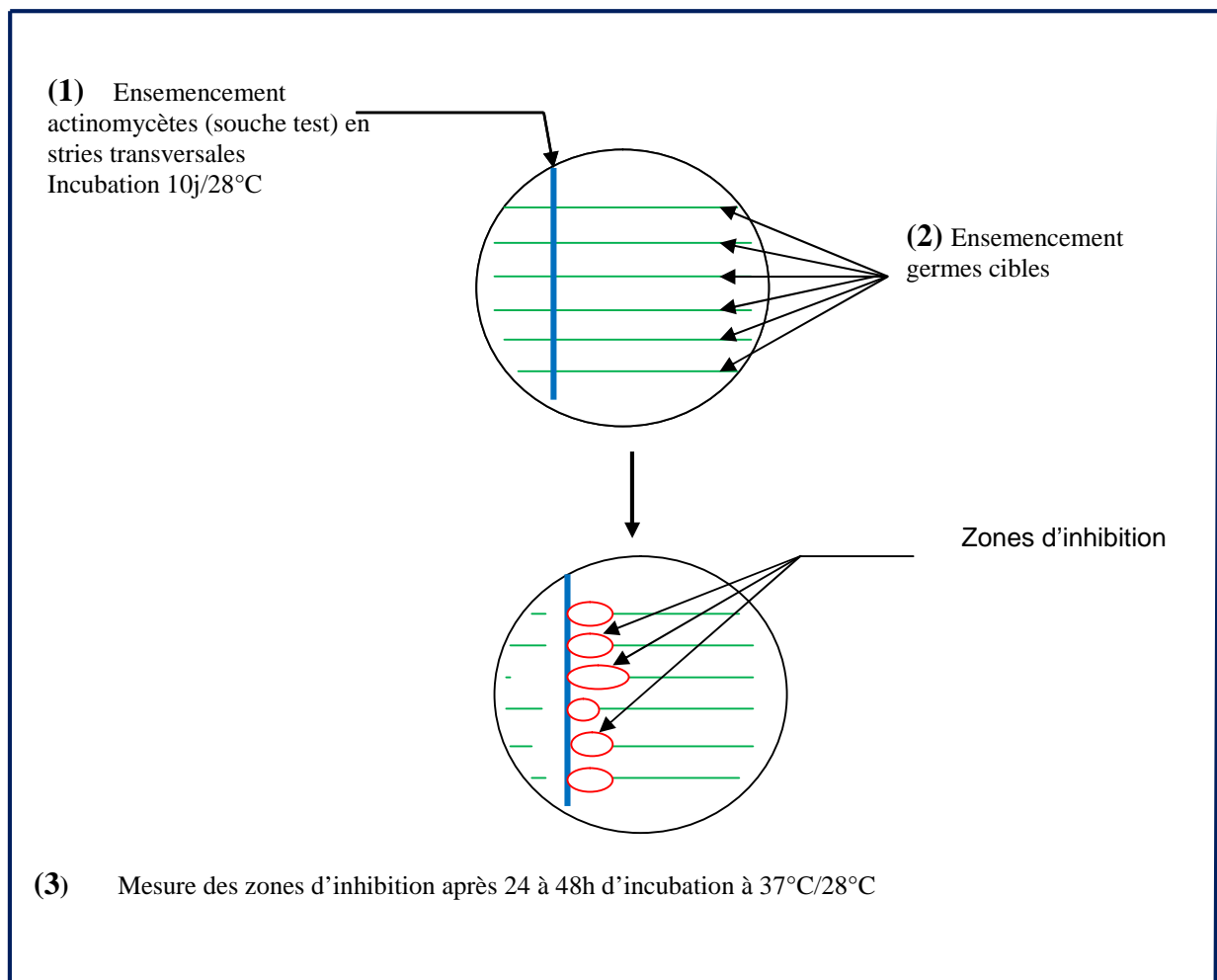


Figure 15 : Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu Williams modifié solide par la méthode des stries croisées (Rothrock et Gottlieb, 1981).

1.2. Technique des cylindres d'agar (Bastide *et al.*, 1986)

L'activité antibactérienne des isolats a été également évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu Muller Hinton.

Cette méthode consiste à ensemencer les souches à tester sur milieu Williams (modifié) et incubé pendant 10 jours à 28°C. Après incubation, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètres sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte pièce à partir de ce milieu et déposés à la surface du milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par le germe cible.

Remarque :

- le mycélium est en contact avec la gélose.
- L'inoculum ne doit pas être utilisé au delà de 15 minutes après de sa préparation.

Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes cibles. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24h d'incubation à 37°C pour les bactéries et après 48h d'incubation à 28°C pour les moisissures. La figure (16) illustre les étapes de la méthode.

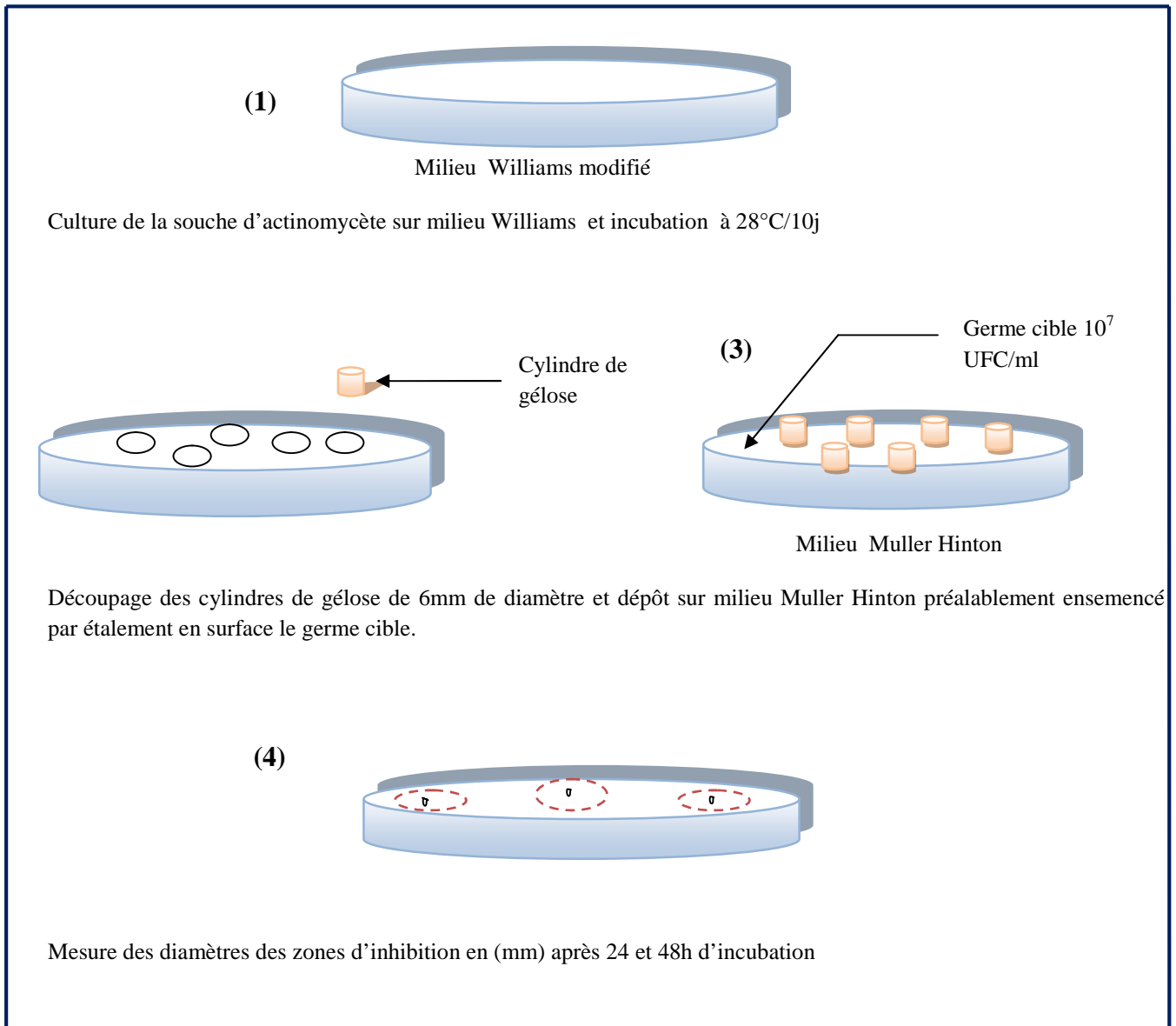


Figure 16 : Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes sur milieu Muller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (**Bastide *et al.*, 1986**).

2. Production et détection des antibiotiques en milieu liquide

2.1. Technique des puits (cité par Nouasri, 1996)

Cette étude est réalisée uniquement pour les souches sélectionnées par le test précédent sur milieu solide, en égard à leur activité antagoniste vis-à-vis des germes cibles.

Pour chaque souche, une préculture est préparée dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu Williams. Cette préculture sert à ensemencer 100 ml du même milieu liquide contenu dans des flacons de capacité de 250 ml. L'incubation a lieu à 28°C sous agitation permanente à 250 rpm. La durée d'incubation est de 7 à 10 jours.

Après incubation, la présence d'antibiotiques est détectée par la méthode de diffusion dans des puits. Un aliquote de 200 µl de bouillon de culture est prélevé stérilement puis introduit dans des puits, sur milieu Muller Hinton (d'une épaisseur > 4mm), préalablement tapissés par une goutte de gélose blanche et ensemencé avec un germe cible (10^7 UFC/ml pour les bactéries et 10^7 spores /ml) pour les champignons. Les boites sont mises à 4°C pendant 2 h afin de permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles, les boites sont par la suite mises à incuber pendant 24 h à 48h à la température de croissance du germe cible. Les diamètres des zones d'inhibition seront alors mesurés à l'aide d'un « pied à coulisse ».

III. Etude taxonomique des souches sélectionnées

1. Les souches sélectionnées

L'étude taxonomique a été réalisée sur des souches sélectionnées sur la base de leur morphologie typique des actinomycètes et leur activité antagoniste vis-à-vis de 6 genres bactériens (3 bactéries à Gram +, 3 bactéries à Gram -), une levure et 3 genres de moisissures.

2. Etude des caractères morphologiques

Est basée sur les caractères cultureux des colonies (croissance, couleur des mycélium aérien et du substrat et la micromorphologie qui consiste en l'étude de la forme et de la taille des spores.

2.1. Macromorphologie.

Cette étude consiste à déterminer la couleur des mycélium aérien et du substrat ainsi que les pigments solubles produits sur différents milieux de culture préconisés par l'« International *Streptomyces* Project » ou ISP (Shirling et Gottlieb, 1966) (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7) et sur le milieu GYEA (Athalye *et al.*, 1981).

La composition de ces milieux est donnée en annexe N°(2).

2.2. Micromorphologie

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique (Optika) à deux grossissements (x400 et x100) après 7 à 14 jours d'incubation.

Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycélium en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique

des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation du mycélium du substrat (**Williams *et al.*, 1989**).

Les isolats ont fait objet d'une coloration de Gram.

3. Analyse des constituants cellulaires et / ou pariétaux

Cette analyse consiste à déterminer d'une part l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) (LL ou DL = méso) et la présence ou non de la glycine au niveau de la paroi cellulaire.

Le DAP étant un composé présent au niveau des parois cellulaires des actinomycètes, et d'autre part la composition cellulaire en sucre. L'étude chimique est un bon critère de distinction des différents groupes d'actinomycètes (**Nouredine, 2006**).

3.1. Obtention de la biomasse

Les isolats sélectionnés et retenus pour la suite de l'étude sont ensemencés dans des tubes contenant 10 ml de milieu Williams liquide modifié et incubés sous agitation (140 rpm) à 28°C pendant 10 à 14 jours, le mycélium est récupéré par filtration, lavé à l'eau distillée puis séché.

3.2. Détermination des acides aminés pariétaux

Elle consiste en la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) et de rapporter la présence ou l'absence de la glycine.

Deux méthodes sont utilisées celle de **Becker *et al.*** (1964) et celle de **Staneck et Roberts** (1974) qui consistent en une hydrolyse cellulaire à chaud en présence de l'acide chlorhydrique selon le protocole suivant :

- 10 ou 3 mg du mycélium sec de chaque isolat d'actinomycète sont hydrolysés pendant 18h à 100°C par 1ml de HCl 6N dans des tubes à vis hermétiquement fermés ;
- Les hydrolysats sont recueillis après filtration sur membrane en verre ou sur du papier Whatman N°1 puis concentrés à sec à l'aide d'un bain de sable à chaud;
- Des lavages répétés à l'eau distillée sont effectués jusqu'à élimination totale de l'HCL ;
- Le résidu sec est finalement repris dans 0,3 ml d'eau distillée puis analysé par chromatographie ;

- **Analyse chromatographique des hydrolysats**

La méthode de **Becker et al.**, (1964) et celle de **Staneck et Roberts** (1974) diffèrent entre elles par le type de migration du chromatogramme.

- Les acides aminés pariétaux sont déterminés par chromatographie descendante à front perdu sur papier pour la méthode de **Becker et al** (1964), et par une chromatographie ascendante sur papier pour la méthode de **Staneck et Roberts** (1974) ;
- 15 et 2 μ l de chaque hydrolysats cellulaire sont déposés sur du papier Whatman n°1 pour chacune des deux méthodes ;
- 10 et 2 μ l de solution aqueuse standard de l'acide diaminopimelique (DAP) (FLUKA) contenant les deux isomères LL et DL (0,01M), de glycine et de la lysine (0,2% w/v) ;
- Un développement d'une durée de 18h en utilisant le solvant méthanol-eau distillée-acide chlorhydrique-pyridine (80/17,5/2,5/10 v/v) pour la chromatographie descendante de Becker. Séchage du papier à température ambiante puis révélation à l'aide d'une solution de ninhydrine à 0,2% (w/v dans de l'acétone), suivie d'un chauffage à 100°C pendant 5 min, où les taches de DAP apparaissent de couleur brun olive virant au jaune vif. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL ; par contre la glycine et la lysine apparaissent de couleur violette et migrent plus rapidement que les isomères de l'acide diaminopimelique (DAP).



Figure 17 : Chromatographie ascendante (Staneck et Roberts, 1974)



Figure 18 : Chromatographie descendante à front perdu (Becker et al., 1964)

3.3. Caractérisation des sucres cellulaires

Les méthodes de caractérisation des sucres utilisées sont celles de **Lechevalier et Lechevalier** (1970b) et **Staneck et Roberts** (1974). Comme pour la caractérisation des acides aminés pariétaux, les deux techniques se différencient par le type de migration du chromatogramme à savoir, la chromatographie descendante à front perdu pour la méthode de Lechevalier et Lechevalier et la chromatographie ascendante pour la méthode de Staneck et Roberts.

Elles consistent à caractériser les sucres cellulaires après une hydrolyse ménagée avec du H₂SO₄.

- 50 mg de mycélium sec sont hydrolysés par 1ml d'acide sulfurique 1N (dans des tubes à vis hermétiquement scellés) pendant 2h à 100°C ;
- Les hydrolysats acides sont neutralisés avec une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de Baryum jusqu'à obtention d'un pH neutre, le précipité blanc formé est éliminé par centrifugation à 4000 tr/min durant 20 min.
- Le surnageant est recueilli, évaporé à sec et le résidu final obtenu est dissout dans 0,3 ml d'eau distillée puis analysé par chromatographies descendante et ascendante sur papier;

Analyse chromatographique des hydrolysats

- 20 µl de chaque hydrolysat sont déposés sur du papier Whatman n°1 de même que 15 µl de chaque solution aqueuse standard des sucres suivants : arabinose, galactose, glucose, ribose, xylose, mannose, rhamnose.
- Les chromatogrammes sont développés durant 36 à 48h par chromatographie descendante à front perdu dans un système de solvant composé par la partie supérieure : d'un mélange de *n*-butanol- eau distillée-pyridine-toluène (5/3/3/1 v/v/v/v) ;
- Le système de solvant utilisé pour la chromatographie ascendante est la partie supérieure du mélange *n*-butanol- eau distillée-pyridine-toluène (10/6/6/1 v/v/v/v) ;
- Après séchage à température ambiante, la révélation est effectuée à l'aide d'une solution de diphénylamine –aniline, après un chauffage de 5 min à 100°C, les taches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et violettes à bleues pour les hexoses.

4. Etude des caractères physiologiques

Une série de tests physiologiques a été réalisée pour la différenciation des espèces d'actinomycètes. Les tests effectués sont cités ci-dessous et les méthodes ainsi que la composition des milieux de culture utilisés sont détaillés en annexe N°(2).

4.1. Production de pigments mélanoides.

La production de pigments mélanoides par les isolats est observée sur milieu gélosé ISP7 dont le virage, du milieu, au brun marron est reconnaissable (Shirling et Gottlieb, 1966).

4.2. Production de nitrate réductase.

Le test de la nitrate réductase est effectué sur bouillon nitraté (**Marchal et Bourdon, 1987**). La réduction des nitrates est constatée par la mise en évidence des nitrites formés à l'aide du réactif de Griess. Les lectures s'effectuent après 7 à 10 jours d'incubation en ajoutant quelques gouttes du réactif de Griess. Le test positif se manifeste par l'apparition d'un halo de couleur rouge.

4.3. Tests de dégradation de divers composés organiques

Cette étude est réalisée sur milieu ISP9 par **Shirling et Gottlieb, (1966)**.

Les sources de carbone testées sont : D-glucose, arabinose, fructose, cellobiose, galactose, lactose, maltose, mannitol, ribose, raffinose, rhamnose, saccharose, xylose et mannose. Les solutions à 1% sont stérilisées séparément à 120°C/20min puis ajoutés aux milieux lors de la préparation.

- Hydrolyse de l'amidon et de la gélatine (**Marchal et Bourdon, 1987**),
- Hydrolyse de la caséine du lait et de la tyrosine (**Gordon et al., 1974**)
- Hydrolyse du tween 80 selon (**Sierra, 1957**).
- Utilisation des sels de sodium : Acétate, citrate et oxalate (**Gordon et al., 1974**).

4.4. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques

La sensibilité aux antibiotiques sur milieu Muller Hinton. (**Athalye et al., 1985**)

Vancomycine : Va 30 (30µg), **Tobramycine** : TOB 10 (10µg), **Tetracycline** : TE 30 (30 µg), **Penicilline** : P 10 (10 U), **Spiramicine** : SP 100 (100 µg), **Erythromycine** : E 15 (15 µg), **Oxytetracycline** : T 30 (30 µg) et **Bacitracine** : B 10 (10 U).

-La sensibilité à différentes concentrations de Chlorures de sodium (NaCl) sur milieu Williams solide ;

-Suivi de la croissance à différents pH sur milieux Williams liquide (en mesurant quotidiennement la densité optique) et solide;

-La croissance à différentes températures 28, 37, 40 et 45°C sur milieu Williams solide (cité par **Boudjella, 2007**).

-La sensibilité au phénol (0,005%), (**Athalye et al., 1985**).

-La sensibilité au tellurite de potassium (0,01% et 0,05%) sur milieu GYEA et Williams solides (Athalye *et al.*, 1985).

IV. Production, extraction, purification partielle et caractérisation des antibiotiques synthétisés.

Les souches d'actinomycètes ayant montré une activité antibiotique intéressante lors des tests préliminaires, sont retenues pour l'étude des antibiotiques qu'elles synthétisent.

1. Production d'antibiotiques en milieu liquide

1.1. Préculture

Le milieu utilisé est celui de Williams modifié (1965).

Des précultures âgées de 3 jours sont tout d'abord préparées sur tubes à partir de fragments mycéliens raclés sur boîtes de Pétri incubées de 7 à 10 jours.

1.2. Culture

Le contenu de chaque tube est inoculé dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu. L'incubation a lieu à 28°C dans un bain Marie avec agitation permanente (240 tours/min) pendant 10 jours.

2. Extraction et purification des antibiotiques

2.1. Extraction par des solvants : (Augustine *et al.*, 2005 ; Badji *et al.*, 2006 & Zitouni *et al.*, 2005).

Après avoir réalisé des cultures liquides sur Erlenmeyers pour chaque souche et obtenu le filtrat de culture.

Une extraction par des solvants organiques de différentes polarités est effectuée.

Il est à signaler que les antibiotiques produits peuvent être extraits à partir du mycélium et/ou du filtrat de culture.

2.1.1. A partir du mycélium

Le mycélium est récupéré après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation à 3000g pour se débarrasser des impuretés et autres résidus du milieu. Le culot mycélien est égoutté, récupéré dans une fiole et immergé dans du méthanol (50 mg de mycélium dans 1 ml de méthanol). Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2h de manière à assurer une homogénéisation convenable (à température ambiante).

L'extrait méthanolique est ensuite récupéré par filtration sous vide puis concentré à sec à 40°C à l'aide d'un Rotavapor. Le résidu sec est, enfin, repris dans 5ml de méthanol, stérilisé par filtration (filtre millipore 0,45µm) et ce, afin de tester son activité par antibiographie.

2.1.2. A partir du filtrat de culture

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Cinq solvants de polarité croissante sont utilisés ; le n-hexane, le benzène, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. (Biochem). Afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction, le filtrat est mélangé dans une ampoule à décanter avec un volume égale de solvant. Les phases organiques et aqueuses sont récupérées séparément concentrées à sec puis reprises dans un volume minimum de méthanol ou d'eau. Ne seront testés que les phases organiques.

2.2. Antibiographie et choix du solvant d'extraction

L'activité inhibitrice des différentes phases organiques obtenues est testée par antibiographie (méthode des puits).

2.2.1. Méthode des puits

Dans cette méthode le milieu utilisé est celui de Muller Hinton qui, une fois coulé dans des boîtes de Pétri, estensemencé avec des germes cibles à raison de 10^7 UFC/ml. Des puits (de 6 mm de diamètre) sont réalisés à l'aide d'un emporte pièce.

Les figures (19 et 20) illustrent les étapes suivies pour l'extraction des antibiotiques (à partir des mycéliums et des filtrats de cultures), la mise en évidence de leurs activités ainsi que le choix du solvant d'extraction par la méthode des puits.

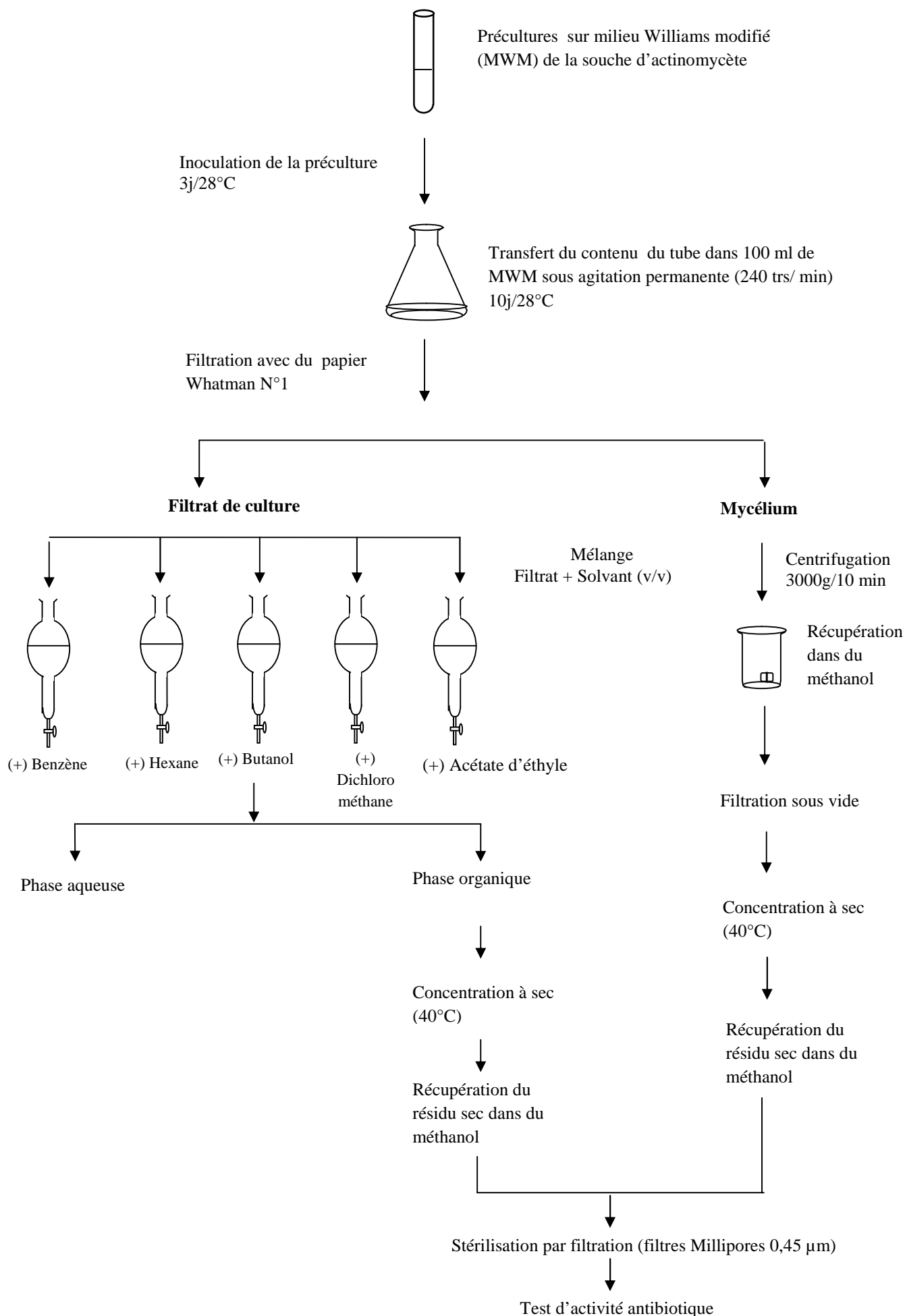


Figure 19 : Protocole d'extraction des antibiotiques à partir des mycéliums et des filtrats de cultures.

Un aliquote de 50µl de surnagent de culture est prélevé stérilement puis introduit dans les puits préalablement tapissé par une goutte de gélose blanche.

Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2h afin de permettre une diffusion des substances actives tout en arrêtant la croissance des germes, puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 28°C pour les moisissures. Le méthanol 95% est utilisé comme témoin négatif.

La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des puits après 24h pour les bactéries et les levures et 48h pour les champignons.

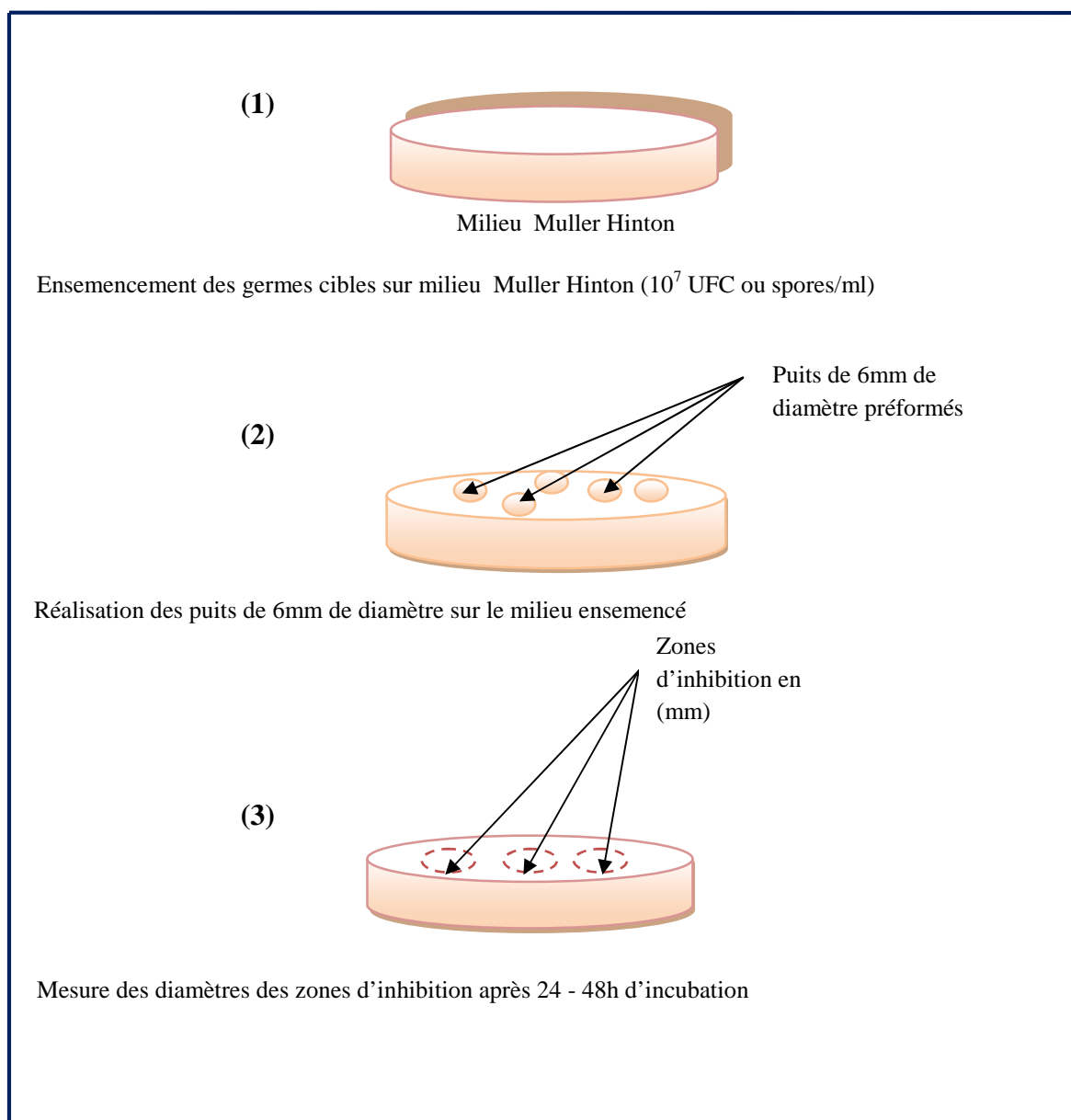


Figure 20 : Sélection du solvant d'extraction après antibiographie : (méthode des puits)

2.3. Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)

Une fois les meilleurs solvants d'extraction mis en évidence pour chaque souche étudiée, il est nécessaire de déterminer le meilleur système de séparation par migration en réalisant une chromatographie sur plaques de gel de silice.

2.3.1. Préparation des plaques de gel de silice

Les plaques de gel de silice (04645) sont préparées en mélangeant 40g de silice (avec le gypse comme liant) et 100 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 250 ml. Après une agitation manuelle vigoureuse, le gel obtenu est étalé de manière régulière et uniforme sur des plaques en verre (20 x 20 cm) à l'aide d'un étaloir de Desaga sous forme de fine couche (0,25mm). Les plaques sont, par la suite, séchées durant une nuit à 37°C et régénérées à 105°C pendant 30 minutes à 1heure avant utilisation.

2.3.2. Développement des plaques et sélection du système d'élution (Boudjella, 2007)

A l'aide d'une micropipette, les extraits des différents solvants (30µl) sont déposés sous forme de spots sur les plaques. Ces dernières sont placées dans des cuves chromatographiques dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec l'un des systèmes de solvants suivants :

- *n*- Butanol - Acide acétique - Eau (**B.A.E**) (60 : 20 : 20) (v/v/v)
- Acétate d'éthyle – Méthanol (**A.M**) : (100 : 15) (v/v)
- Ethanol – Ammoniaque - Eau (**E.A.E**) : (80 :10 :10), (90 :5 :5), (60 :20 :20) et (40 :30 :30).
- Acétonitrile – Eau (**AN.E**) : (30 : 70) et (50 : 50) (v/v)

Après développement, les plaques sont mises à sécher durant toute une nuit dans le but d'éliminer toute trace de solvant susceptible d'empêcher la croissance du microorganisme test lors de la bioautographie.

Une fois séchées, les plaques sont observées sous lumière UV afin de localiser les taches présentant une absorbance à 254 nm ou une fluorescence à 366 nm. La chambre noire utilisée pour la visualisation des plaques est représentée dans la figure (21).



Figure 21 : Chambre de visualisation UV

2.3.3. Bioautographie (Betina, 1973)

Cette méthode consiste d'une part, à détecter les taches actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leur rapports frontaux (Rf) respectifs et d'autre part, à choisir le meilleur système de solvant de migration permettant de séparer le mieux les antibiotiques entre eux ou des autres composés non actifs.

Les plaques sont placées sur un support en verre dans une boîte en polyéthylène (22 x 24 cm). A la base de la boîte, une feuille de papier filtre imbibées d'environ 30ml d'eau stérile afin de maintenir une atmosphère humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est stérilisé durant 1 h sous UV à 254 nm.

Un volume de 50 ml de gélose molle (semi solide) Muller Hinton en surfusion est inoculé avec 1ml de la suspension de germe cible contenant 10^7 UFC/ml (DO= 0,5).

Ce milieu est réparti de façon homogène et uniforme avec une pipette stérile sur les plaques.

Après solidification, la boîte est mise à 4°C pendant 2 h afin de permettre la diffusion de (s) substance (s) antibiotique (s) dans le milieu puis incubée à 28°C.

Les zones d'inhibition sont notées après 24 à 48 h et les Rf calculés selon la formule :

$$Rf = \frac{\text{Distance entre le dépôt et la position de migration de la tache active}}{\text{Distance entre le dépôt et le front de migration du solvant}}$$

3. Révélation chimique des antibiotiques (Merck, 1975)

Après avoir sélectionné le meilleur système de migration et déterminé les Rf des différentes tâches d'extraits bruts ; d'autres plaques sont développées dans les mêmes conditions. Celles-ci vont servir à des révélations chimiques. Les surfaces des plaques sont alors pulvérisées avec les différents révélateurs chimiques.

Les taches apparaissent soit à froid, soit après un chauffage de 5 à 10 min à 100°C.

Les différents révélateurs utilisés sont :

- **Le chlorure de fer ferrique (FeCl₃)** : révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.
- **Le diphenylamine-aniline** : révélateur des glucides.
- **La ninhydrine** : révélateur des amines, des acides aminés et des osamines.

- **La vanilline-acide sulfurique** : révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées.
- **Le formaldéhyde-acide sulfurique** : révélateur des aromatiques polycycliques.
- **Le réactif de Dragendorff selon Meunier et Macheboeuf** : révélateur de la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylethanolamine (PE).
- **Le réactif de Tollens, Zaffaroni** : révélateur des substances réductrices

La composition et le mode d'utilisation de ces révélateurs sont donnés en annexe N°(3)

4. Etude spectroscopique des antibiotiques

4.1. Spectroscopie UV- visible

L'étude spectrophotométrique permettant la distinction entre les polyènes et les non-polyènes a été employée par plusieurs auteurs (**Lindenfelser *et al.*, 1964 & Bastide *et al.*, 1986**). Les polyènes présentent des spectres caractérisés par une série de pics entre 260-405 nm (**Hamilton-Miller, 1973 & Bastide *et al.*, 1986**). L'étude spectroscopique dans l'UV-visible permet d'avoir un aperçu sur la nature chimique des produits extraits.

Le spectre UV-visible est déterminé entre (190 - 500 nm) sur les extraits bruts, afin de noter la présence ou l'absence de composés polyéniques lesquels présentent 3 pics, caractéristiques à chaque type de polyènes. A titre d'exemple les Triènes : le premier pic apparaît à une longueur d'onde de 283 nm, le second à 272 nm et le troisième à 262 nm (**Boudjella, 2007 et Nouredine, 2006**).

Les extraits sont solubilisés dans du méthanol pur puis analysés par spectrophotomètre UV, précédemment étalonnés avec du méthanol.

PARTIE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie III : Résultats et Discussion

Dans ce qui suit, seront abordés les résultats et les discussions des quatre parties de ce travail, relatifs à l'isolement des souches actinomycetales, la mise en évidence de leur activité antibiotique, l'étude taxonomique des souches sélectionnées et enfin, la production, l'extraction et la caractérisation partielle des substances bioactives synthétisées.

I. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antimicrobiens

1. Origine et prélèvement des échantillons et caractérisation physicochimique du sol

1.1. Origine des prélèvements et caractérisation physicochimique du sol

Les échantillons de sol étudiés proviennent de la région d'Iadnanen, commune de Feraoun, localité située au sud ouest du chef lieu de la wilaya de Bejaia. Cette région est caractérisée par la salinité de ses sols. Le prélèvement a été effectué durant le mois d'Avril 2008.

L'analyse du sol a été effectuée au niveau du laboratoire de biologie des sols (pédologie) de l'université de Bejaia.

La texture a été déterminée, après décarbonatation, par sédimentation à la pipette de Robinson. La teneur en matière organique a été mesurée par analyse du carbone total par la méthode Anne modifiée.

Le calcaire total (CaCO_3) a été mesuré par la méthode gazovolumétrique en utilisant le calcimètre de Bernard. Le pH a été mesuré dans une solution de sol de rapport 1 :2,5 et enfin, la salinité a été mesurée par la conductivité électrique de l'extrait aqueux du sol à 25 °C (USSL Staff, 1954).

Les caractéristiques physicochimique et granulométrique du sol étudié sont présentées dans les tableaux (VII et VIII).

Tableau VII: Analyses physicochimiques des échantillons de sol de la région d'Iadnanen

Analyses	pH eau 1/ 2,5	Acidité d'échange	Carbone (%)	Matière organique (%)	CaCO_3 total (%)	Calcaire actif (%)	Conductivité électrique (mS/cm)	Humidité (%)
Valeur déterminée	8,06	7,83	0,78	1,34	20,5	42,5	8,7	20,71

L'analyse granulométrique a pour but de donner la composition élémentaire du sol ou texture du sol, en classant les particules minérales en groupes correspondants à des dimensions définies.

La texture constitue un caractère fondamental du sol, car elle influe sur de nombreuses propriétés telles que :

- La perméabilité du sol à l'eau et à l'air
- La rétention de l'eau
- La réserve en éléments nutritifs.

Tableau VIII: Résultats de l'analyse granulométrique de l'échantillon de sol du site d'Iadnanen

Granulométrie %				Texture USDA
Argiles	Limons	Sables fins	Sables grossiers	
24,27	42,07	27,23	6,41	Limoneuse

Les résultats des analyses physicochimiques et granulométriques nous indiquent que le sol est de texture limono-calcaire (42,7%), il est ainsi caractérisé par le phénomène de battance.

La teneur en matière organique est faible (1,34%), chose qui a été constatée in situ : le site de prélèvement est dépourvu de végétation. Le calcaire total présente une valeur moyenne (20,5%). La conductivité électrique mesurée indique que la salinité est élevée (8,7 mS/ cm). En effet, selon l'échelle de Riverside USA (annexe 4), citée par **Mathieu et Pielain**, (2003), qui établit la classification des sols selon leurs salinité, la valeur obtenue indique que notre sol est un sol très salin.

Le pH du sol dépasse la valeur de 7,5 (tableau VII) ce qui le place dans la catégorie des sols alcalins, qui s'explique par sa richesse en calcaire.

II. Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes

Au total, 156 souches présentant une morphologie caractéristique des actinomycètes ont été obtenues par la méthode des suspensions-dilutions et ce à partir de 11 échantillons de sol d'Iadnanen sur milieu Williams additionné de 7,5% de NaCl, et de cycloheximide (50 µg/ml).

Ces souches ont été purifiées et conservées à 4°C sur le même milieu d'isolement. Le nombre d'isolats par échantillon de sol est variable.

Seules 16 souches ont été retenues sur la base de leurs morphologie caractéristique peu commune mais aussi parce qu'elles présentaient une phase de latence assez courte (4 à 5 jours d'incubation), ce qui est un facteur de choix déterminant, pour les tests d'activité. Parmi celles-ci, 8 ont présenté une activité antibactérienne vis-à-vis des 3 bactéries à Gram positif testées (*B. subtilis*, *M. luteus* et *S. aureus*). Ces souches se sont révélées inactives sur les bactéries à Gram négatif

(*E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*) ainsi que sur les champignons filamenteux (*Asp. niger*, *C. albicans*, *F. polyferatum* et *M. rammannianus*). Considérant les performances des souches étudiées, nous avons opté pour les 4 isolats présélectionnés, provenant de l'isolement effectué en Avril 2007 (purifiées et conservées à 4°C sur milieu Williams modifié à deux concentrations en NaCl à savoir 5% et 7,5%) et dont l'étude a été entamée au laboratoire sous la direction du D^r Kecha. L'activité antibiotique des isolats a été testée aussi bien sur milieu solide que sur milieu liquide.

En Algérie, une série de travaux (**Boudjella, 1994 ; Zitouni, 1995 ; Nouasri, 1996 et Kecha, 1996**) portant sur l'isolement de genres rares d'actinomycètes, la taxonomie des souches isolées et l'étude préliminaire des antibiotiques secrétés, a été réalisée.

Ces travaux ont montré que les sols sahariens, qui représentent un écosystème particulier, referment un potentiel assez riche en actinomycètes tant du point de vue quantitatif et de la biodiversité que du point de vue des propriétés antagonistes aussi bien antibactériennes qu'antifongiques (**Sabaou et al., 1998**). Plus récemment, les travaux réalisés par **Zitouni et al. (2004 a,b)** et **Zitouni (2005)** ont montré qu'une souche du genre *Saccharothrix* SA 103, sécrète plusieurs antibiotiques originaux appartenant aux familles des anthracyclines, des macrolides et des nucléotides.

Toutefois, peu de travaux scientifiques portant sur le criblage et la biodiversité des actinomycètes dans les environnements salins ont été rapportés.

Kitouni et al., (2005), **Boughachiche et al., (2005)** de l'université de Constantine travaillent également sur quelques écosystèmes particuliers notamment :

- ✚ La « Sebkhia » de Ain Mlila, qui représente un environnement salin, et
- ✚ Les hautes altitudes en raison de leurs richesses en flores et faunes particulières.

1. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide

Les quatre souches ont donc été sélectionnées et retenues pour la suite du travail.

La souche codée S₆ présente les caractéristiques spécifiques du genre *Streptoverticillium*, tandis que les trois autres présentaient plutôt une morphologie propre au genre *Streptomyces*, ces souches ont été codées S₉, S₁₇ et S₂₉.

Les méthodes, de mise en évidence de l'activité antibiotique, utilisées sont celle des stries croisées et des cylindres d'agar.

1.1 Méthode des stries croisées.

Les souches S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉ ont été testées contre plusieurs microorganismes saprophytes ou pathogènes pour l'homme (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E coli*, *Candida albicans*...) ou pour les plantes (*Fusarium polyferatum*).

Les souches de levure et de champignons inférieurs utilisées pour la détection rapide d'une activité antifongique ont été choisies pour les raisons suivantes:

1. *Candida albicans*, très souvent impliquée dans les infections fongiques.
2. *Mucor rammanianus*, champignon sensible aux substances antifongiques (Bastide *et al.*, 1986).
3. *Aspergillus niger*, champignon responsable des mycoses invasives (Badji, 2005).

Les résultats obtenus ont montré un antagonisme vis-à-vis de bactéries à Gram +, de champignons et d'une levure mais pas contre les bactéries à Gram négatif. (Tableaux : IX, X, XI et XII).

La figure (25) illustre quelques activités antibiotiques des 4 souches étudiées vis-à-vis de différents germes cibles par la méthode des stries croisées.

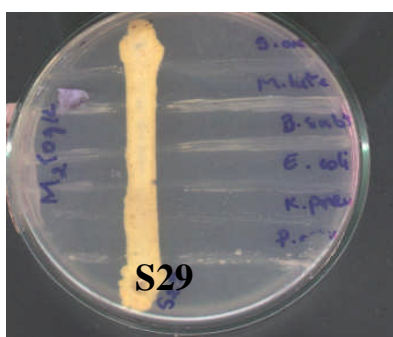


Figure 25 :- a- Activité antagoniste de la souche S₂₉ vis-à-vis de bactéries Gram + et Gram -



Figure 25 :- b- Activité antagoniste de la souche S₂₉ vis-à-vis de *Candida albicans*

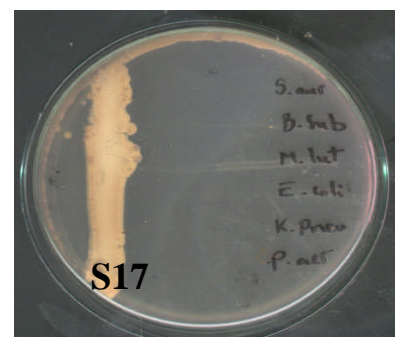


Figure 25 :- c- Activité antagoniste de la souche S₁₇ vis-à-vis de bactéries Gram + et Gram -

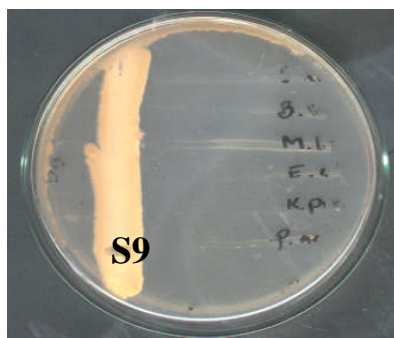


Figure 25 :- d- Activité antagoniste de la souche S₉ vis-à-vis de bactéries Gram + et Gram -

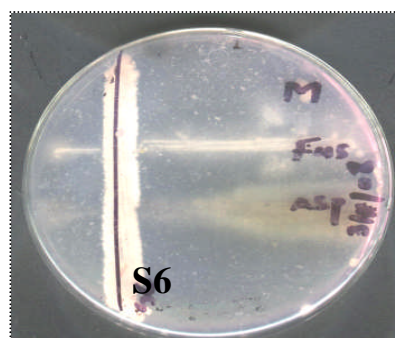


Figure 25 :- e- Activité antagoniste de la souche S₆ vis-à-vis ds champignons

Figure 25 : Activité antagoniste des souches testées (S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉) par la méthode des stries croisées.

1-2 Méthode des cylindres d'agar

D'une manière générale, l'isolat S₆ présente une action particulièrement importante contre les bactéries à Gram +, notamment *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* dont les zones d'inhibition sont respectivement 25 et 19 mm, contre les champignons testés notamment

Aspergillus niger et *Fusarium polyferatum*, et moyenne à faible vis-à-vis de la levure *Candida albicans*. (Tableau IX).

La souche S₉, présente un antagonisme remarquable vis-à-vis des bactéries à Gram positif pour les deux méthodes utilisées où le diamètre des zones d'inhibition a atteint 30 mm pour l'espèce *B. subtilis* et des champignons notamment à l'encontre d'*Aspergillus niger* mais également une action vis-à-vis de la levure *Candida albicans* pour laquelle la méthode des stries croisées a permis de distinguer une diminution de la croissance du microorganisme cible par la méthode des cylindres d'agar où l'inhibition était très claire.

Les isolats S₁₇ et S₂₉ présentent également des actions importantes vis-à-vis des bactéries à Gram positif notamment *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* et des champignons testés plus particulièrement *Aspergillus niger* et *Fusarium polyferatum*. L'activité antilevurienne des deux souches est intéressante et atteint 15 mm de diamètre par la méthode des cylindres d'agar et 26 mm pour la méthode des stries croisées caractérisée également par une diminution de la croissance.

Nous remarquons que les activités antimicrobiennes des souches testées sont mieux exprimées par la méthode des cylindres d'agar. Cette méthode permet une meilleure visualisation et observation des zones d'inhibitions, compte tenu du fait que c'est une méthode où l'inoculum des germes cibles utilisé est standardisé, ce qui n'est pas le cas pour la méthode des stries croisées.

Tableau IX: Action antagoniste des souches S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉ vis-à-vis des bactéries, des champignons filamenteux et d'une levure sur milieu MULLER HINTON.

Microorganismes cibles		Méthode des stries croisées (mm)				Méthode des cylindres d'agar (mm)			
		S6	S9	S17	S29	S6	S9	S17	S29
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	13	15	10	8	16	17	0
	<i>Micrococcus luteus</i>	8	18	13	0	19	20	18	11
	<i>Bacillus subtilis</i>	10	25	13	25	25	30	20	13
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	0	25	0	0	0	0	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	15	0	0	0	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	12	15	0	0	0	0	0
Levure	<i>Candida albicans</i>	15	10 (ral)	26 (ral)	18 (ral)	0	16	15	12
Champignons	<i>Fusarium polyferatum</i>	20(ral)	7	0	5	0	13	20	13
	<i>Aspergillus niger</i>	20(ral)	11	0	11	0	26	20	26
	<i>Mucor rammanianus</i>	0	0	0	12	12	16	16	0

(ral) : ralentissement prononcé de la croissance.

Note : -Stries croisées : mesure de la zone d'inhibition (en mm) entre le bord de l'actinomycète et celui du germe cible.
Cylindre d'agar : mesure du diamètre d'inhibition (en mm) des germes cibles, y compris le diamètre du cylindre qui est de 6 mm. - (ral) : ralentissement prononcé de la croissance.

Les figures suivantes montrent quelques activités antibiotiques des 4 isolats vis-à-vis de différents germes cibles par la méthode des cylindres d'agar.

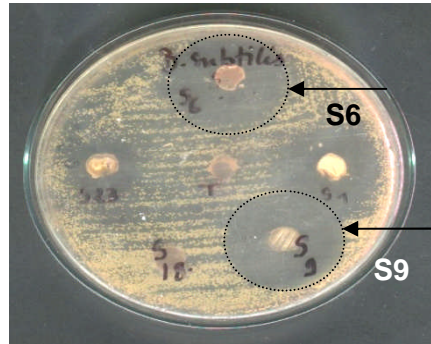


Figure 26 : -a- Activité antagoniste des isolats S6 et S9 vis à vis de *Bacillus. subtilis*

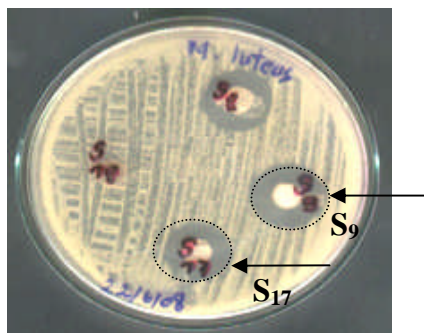


Figure 26 : -b- Activité antagoniste des isolats S9 et S17 vis-à-vis de *M. luteus*



Figure 26 : -c- Activité antagoniste des isolats S6 et S9 vis-à-vis de *M. luteus*



Figure 26 : -d- Activité antagoniste des isolats S6 et S9 vis-à-vis de *S. aureus*

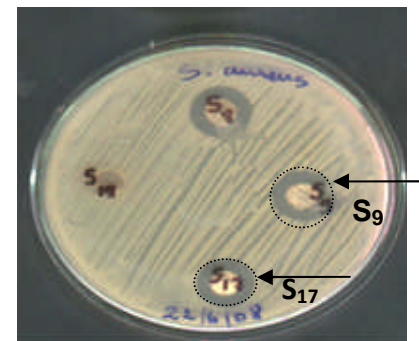


Figure 26 : -e- Activité antagoniste des isolats S9 et S17 vis-à-vis de *S. aureus*

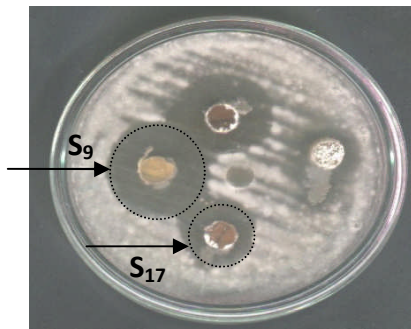


Figure 26 : -f- Activité antagoniste des isolats S₉ et S₁₇ vis-à-vis de *Asp. niger*



Figure 26 : -g- Activité antagoniste de l'isolats S₂₉ vis-à-vis de *Asp. niger*

Figure 26 : Activité antagoniste des souches testées mises en évidence par la méthode des cylindres d'agar.

2. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu liquide

Dans le but de déterminer la capacité des souches à produire des antibiotiques en milieu liquide, la méthode de diffusion dans des puits a été adoptée.

Les quatre souches ont été testées vis-à-vis de 3 bactéries Gram +, 3 bactéries Gram –, des champignons filamenteux ainsi qu'une levure.

Le bouillon de culture brut, non concentré, de chaque isolat a été prélevé stérilement puis introduit dans des puits creusés sur milieu Muller Hinton préalablement ensemencé avec un germe cible.

Les résultats de ce test n'ont révélés aucune activité envers les microorganismes cibles.

3- Discussion

L'utilisation du milieu Williams additionné de cycloheximide comme antifongique sélectif nous a permis d'isoler à partir d'échantillons de sol salin de la région de Bejaia, des souches d'actinomycètes halophiles modérées.

Tous les isolats sont doués, chacun, d'au moins deux activités antibiotiques sur milieu solide. Ces activités sont variées : antibactérienne, antifongique et/ou antilevurienne, présentant ainsi plusieurs substances dotées d'un large spectre d'action.

L'activité antibactérienne la plus importante est enregistrée avec l'isolat S₉ contre la bactérie Gram positif *B. subtilis* (30 mm). Les activités antilevurienne et antifongique les plus importantes sont relevées pour les isolats S₉ et S₂₉ notamment vis-à-vis de *Aspergillus niger* (26 mm) et pour S₁₇ à l'encontre de *C. albicans*.

Toutefois, aucun des isolats n'a présenté d'activités vis-à-vis des bactéries Gram négatif utilisées : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Selon **Srivibool et Sukchotiratana**, (2006), qui ont obtenu des résultats comparables, expliquèrent que l'absence d'activité antibiotique vis-à-vis des bactéries à Gram négatif ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci, dans le milieu, car n'étant pas polaire ou bien constituée de composés non polaires.

Il est également probable que ces bactéries nécessitent, pour la production de certaines substances antibiotiques, des milieux de culture spécifiques.

Boughachiche et al. (2005) et **Boudemagh et al.** (2005), expliquent que les variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture.

Nos résultats sont à rapprocher d'une étude réalisée par **Sacramento et al.** (2004) qui expliqua la variété des activités enregistrées, entre autres, par la synthèse d'une nouvelle substance antimicrobienne, capable d'agir aussi bien sur la paroi cellulaire fongique que bactérienne.

Ces résultats sont intéressants du fait qu'ils rendent compte du potentiel antimicrobien des souches d'actinomycètes halophiles modérées se développant sur un milieu synthétique.

Durant les tests, il a été remarqué que les quatre souches étudiées avaient perdues leur potentiel antagoniste et inhibiteur vis-à-vis des germes cibles sur milieu liquide, cela peut être dû à la faible concentration de l'agent antimicrobien.

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs qui étudièrent l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes, pour lesquels les activités ont été rapportées uniquement sur milieux solides (**Maruyama et al.**, 1975 et **Valan Arasu et al.**, 2008).

D'après **Moncheva et al.** (2002) cela peut probablement être dû à l'inadéquation du milieu de culture liquide utilisé pour la production d'antibiotiques. D'autres études ont présentés des résultats comparables. En effet, **Nedialkova et Naidenova**, (2005) et **Singh et al.** (2006) ont observé une réduction voir une absence d'activité en milieu liquide en comparaison avec celle observée par la méthode des cylindres d'agar (en milieu solide).

Shomura et al. (1979) et **Iwai et Omura**, (1982) ont également remarqué que la production apparente ne se faisait que sur milieux solides et le passage aux milieux liquides pose quelquefois

des problèmes quant à la production d'antibiotiques. Ils expliquent cela par le fait que la répartition des nutriments dans les milieux liquides varie avec le temps de fermentation alors que leur distribution autour des colonies poussant sur les milieux solides ne varie pas ou varie très peu. **Shomura *et al.*** (1979) a noté également une relation étroite entre la morphologie des filaments mycéliens et la productivité. En effet, le mycélium végétatif prend une forme filamenteuse lorsque l'antibiotique est produit en milieu solide, il est cependant fragmenté en milieu liquide et aucune activité antimicrobienne n'est détectée.

Ces isolats (S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉) ont donc été sélectionnés pour la suite de l'étude portant sur leur taxonomie et leur activité antimicrobienne.

Le choix a été fait principalement sur la base de leur activité antibiotique.

III. Etude taxonomique des souches sélectionnées.

1. Détermination du genre

1.1. Etude des caractères morphologiques

Celle-ci a porté sur des critères macromorphologiques et micromorphologiques.

1.1.1 Macromorphologie.

Les colonies de l'isolat S₆ cultivées sur divers milieux à 28°C pendant 21 jours sont de forme circulaire d'aspect cotonneux et duveteux sur certains milieux (ISP1 et Williams) et rugueux sur d'autres (GYEA) avec un diamètre variant de 2-10 mm. L'isolat présente une croissance et une sporulation abondante sur les milieux Williams modifié (7,5% NaCl), ISP1, ISP2 et ISP4. La croissance est relativement moyenne sur milieu GYEA ; elle est par contre faible voir absente sur le milieu ISP3.

Le mycélium est stable et non fragmenté. Le mycélium aérien (MA) est blanc-rosâtre. Celui du substrat varie selon le milieu utilisé, du blanc à beige, du rose clair au rose foncé et aucun pigment diffusible n'a été constaté sur les milieux de culture utilisés.

Pour les isolats S₉ et S₁₇, il a été constaté que, d'une manière générale, la croissance et la sporulation sont relativement bonnes sur les milieux : Williams modifié (7,5% NaCl), ISP1, ISP2, ISP4 et GYEA et très faible voir absente sur milieu ISP3, à 28°C pendant 21 jours d'incubation.

Les colonies présentent un aspect de craie, poudreux et rugueux selon le milieu employé et se présentent sous forme de cratères pour l'isolat S₁₇, avec des diamètres de 2-6 mm.

La production du mycélium aérien (MA) est observée sur tous ces milieux, le MA présente une couleur beige crème à beige jaune pour la souche S₉ et beige crème à beige clair pour S₁₇, tandis

que celle du mycélium du substrat varie selon le milieu de culture : de jaune clair à marron clair pour S₉ et beige à marron pour l'isolat S₁₇. La production de pigments diffusibles sur ces différents milieux a également été observée, de marron à marron brun.




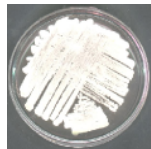
Les colonies de l'isolat S₂₉ sont légèrement bombées de forme circulaire présentant un aspect de craie (poudreux), avec un diamètre variant de 2-6 mm.

A noter que la souche S₂₉ présente une croissance et une sporulation relativement importantes sur tous les milieux utilisés, elle ne présente cependant aucune croissance sur ISP3.

La couleur du mycélium aérien est presque similaire aux deux souches précédemment citées, par contre pour le mycélium du substrat, elle est plus foncée, jaune foncé à marron foncé. Les pigments diffusibles, de couleur brune à marron, ont été observés sur tous les milieux utilisés.

La description de l'ensemble des résultats de l'étude macromorphologique est rapportée dans les tableaux (X et XI).

Tableau X: Caractéristiques macromorphologiques des isolats S₆ et S₉

Isolat	Milieux de culture	Caractères cultureux (21 j)			Croissance Après 21 jours	Sporulation Après 21 jours
		Couleur et aspect du mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments solubles		
S₆	ISP1	Blanc-teinte rose, <i>duveteux</i>	Rose clair	Non produits	+++	++ 
	ISP2	Blanc-teinte rose <i>aspect de cratère</i>	Rose clair	Non produits	+++	++
	ISP3	Non produits	Non produits	Non produits	-	-
	ISP4	Blanc- rose très clair	Blanc cassé-beige	Non produits	+++	+++
	GYEA	Blanc- teinte rose, <i>colonies bombées et rugueuses</i>	Crème	Non produits	+++	++
	Williams (modifié)	Blanc –légère teinte rose. <i>Cotonneux et duveteux</i>	Rose foncé	Non produits	++++	++++ 
S₉	ISP1	Beige – crème	Marron clair	Brun marron	+++	+++
	ISP2	Beige –crème	Jaune - marron clair	Brun marron	++++	++++
	ISP3	Non produits	Non produits	Non produits	-	-
	ISP4	Beige	jaune clair	Brun marron	++++	++++ 
	GYEA	Beige-jaune clair. <i>Colonies rugueuses</i>	Marron clair	Brun marron	++	+
	Williams (modifié)	Beige-crème	Jaune-marron clair	Marron	++++	++++ 

Note : Croissance ou sporulation : ++++ : abondante ; +++ : bonne ; ++ : moyenne ; + : faible ; - : nulle.

Tableau XI: Caractéristiques macromorphologiques des isolats S₁₇ et S₂₉

Isolat	Milieux de culture	Caractères cultureux (21j)			Croissance Après 21 jours	Sporulation Après 21 jours
		Couleur et aspect du mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments solubles		
S17	ISP1	Crème –beige	Jaune clair	Marron-brun	+++	+++
	ISP2	Beige –crème	Jaune - marron clair	Marron-brun	++++	++++
	ISP3	Non produits	Non produits	Non produits	–	–
	ISP4	Beige-jaune	Jaune clair-crème	Marron-brun	++++	++++
	GYEA	Beige clair. <i>Colonies rugueuses à aspect de craie</i>	Beige	Marron-brun	++	+
	Williams (modifié)	Beige-crème	Marron	Marron-brun	++++	++++
S29	ISP1	Beige –crème	Jaune clair - blanc cassé	Brun marron	++++	++++
	ISP2	Beige – crème	Marron foncé	Brun marron	++++	+++
	ISP3	Pas de croissance	Pas de croissance	Non produit	–	–
	ISP4	Beige et aspect de craie	Jaune foncé	Brun marron	++++	++++
	GYEA	Beige-jaune clair <i>Colonies poudreuses à aspect de craie</i>	Marron clair	Brun marron	+++	+++
	Williams (modifié)	Beige-crème	Jaune foncé à marron	Brun marron	++++	++++

Note : Croissance ou sporulation : ++++ : abondante ; +++ : bonne ; ++ : moyenne ; + : faible ; – : nulle.

1.1.2. Micromorphologie

❖ Isolats S₆

Le mycélium du substrat est ramifié et non fragmenté sur les milieux solides.

Le mycélium aérien se présente sous forme de filaments épais portant des chaînes de spores courtes et agencées en verticilles primaires ou secondaires.

Les verticilles sont constitués par de courts sporophores qui émergent d'un point commun et qui portent les chaînes de spores figure (27). Les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotés sont absents.

La figure (27) montre les verticilles portant les chaînes de spores au niveau du mycélium aérien observé au microscope optique (x100) et (x 400)

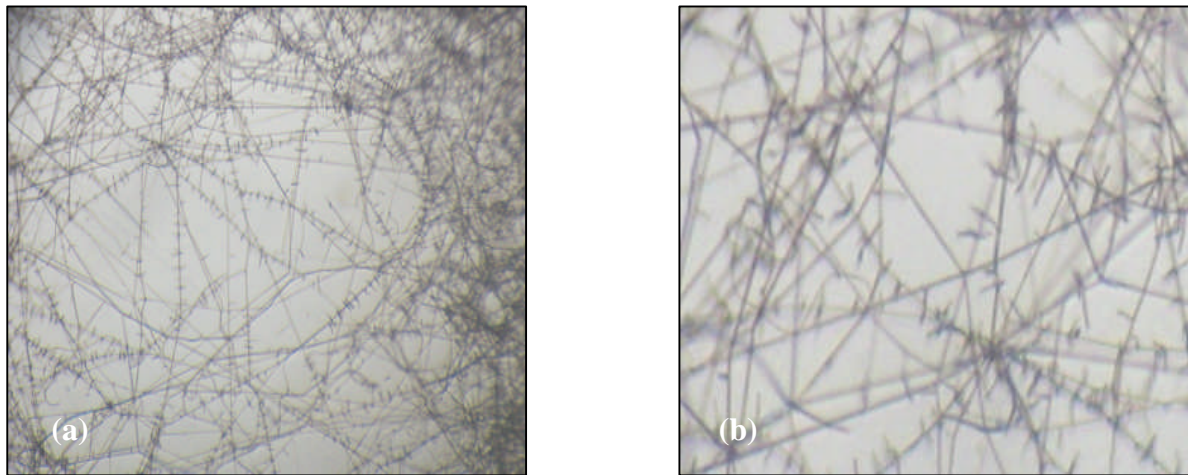


Figure 27 : Micromorphologie de la souche S₆ cultivée pendant 21 jours à 28°C, vu au microscope optique : des filaments du mycélium aérien (chaînes de spores en forme de verticilles). (a) : Gr x100 ; (b) : Gr x400.

❖ Isolats S₉, S₁₇ et S₂₉

Les filaments du mycélium aérien des trois isolats sont non cloisonnés, fins sans formes caractéristiques et se fragmentent en de longues chaînes de spores sphériques et/ou en bâtonnets. Les sporophores, les sporanges, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotés sont absents.

La figure (28) représente le mycélium aérien des isolats S₉ et S₁₇ observés au microscope optique (x100).

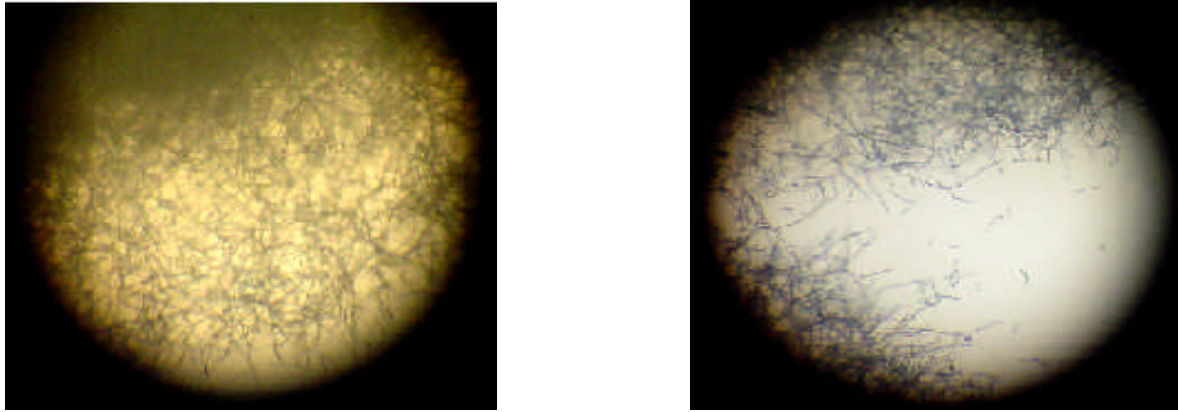


Figure 28 : Micromorphologie des souches S₉ et S₁₇ cultivées pendant 21 jours à 28°C, vu au microscope optique : des filaments du mycélium aérien. Gr x100

1.2. Analyse des constituants cellulaires et pariétaux

1.2.1. Détermination des acides aminés pariétaux

La détermination du type d'isomère de l'acide diaminopimélique a été effectuée en utilisant deux méthodes chromatographiques différentes, précédées d'une hydrolyse acide similaire.

- La chromatographie à front perdu (Becker *et al.*, 1965), a duré 24h. Elle a permis de mettre en évidence la présence, dans la paroi, de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique ainsi que de la glycine, pour les isolats, S₆, S₉ et S₂₉. L'isolat S₁₇ n'a pas donné de taches visibles.

- La chromatographie ascendante sur papier (Staneck et Roberts, 1974), a duré 4h. Elle a révélé la présence, dans la paroi, de l'isomère LL du DAP pour les isolats, S₆, S₉ et S₂₉, mais également la présence de glycine pour les trois souches citées plus haut. Là aussi aucune tache n'a été obtenue pour l'hydrolysate de la souche S₁₇.

1.2.2. Caractérisation des sucres cellulaires

La présence de sucres cellulaires taxonomiquement importants a été mise en évidence selon les méthodes de Lechevalier et Lechevalier, (1970) et Stanek et Roberts, (1974), en utilisant, comme pour les acides aminés, deux procédés chromatographiques différenciables selon le sens de migration du chromatogramme comme cela a été le cas pour les acides aminés pariétaux.

L'analyse a permis de détecter la présence du glucose dans les quatre hydrolysats testés et pas de sucres caractéristiques aussi bien par chromatographie descendante qu'ascendante.

Dans les tableaux qui suivent, nous présentons les résultats des analyses des constituants cellulaires pariétaux (acides aminés et sucres) obtenus après chromatographie sur papier (descendante à front perdu).

Les deux types de chromatographies ont permis d'avoir les profils en acides aminés et en sucres de trois isolats. Cependant, une meilleure séparation des taches a été remarquée pour la chromatographie descendante à front perdu, cela s'explique probablement, la aussi, par le temps de migration (24h) qui a permis une bonne séparation des constituants cellulaires et pariétaux.

Tableau XII: Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat S₆, en acides aminés et sucres, par chromatographie sur papier.

Isolat S6				
Constituants cellulaires	Couleur des taches	Rapport frontal (RF)	Réactif de détection	Identification des composés cellulaires
Acides aminés	Tache violette	Rf= 0,74	Ninhydrine	Glycine
	Tache brune virant au jaune	Rf= 0,64		Acide LL-diaminopimélique
Sucres	Tache brune (marron clair)	Rf= 0,83	Diphenylamine-aniline	Glucose

Tableau XIII : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat S₉ par chromatographie sur papier.

Isolat S9				
Constituants cellulaires	Couleur des taches	Rapport frontal (RF)	Réactif de détection	Identification des composés cellulaires
Acides aminés	Tache violette	Rf= 0,75	Ninhydrine	Glycine
	Tache brune virant au jaune	Rf= 0,68		Acide LL-diaminopimélique
Sucres	Tache brune (marron clair)	Rf= 0,83	Diphenylamine-aniline	Glucose

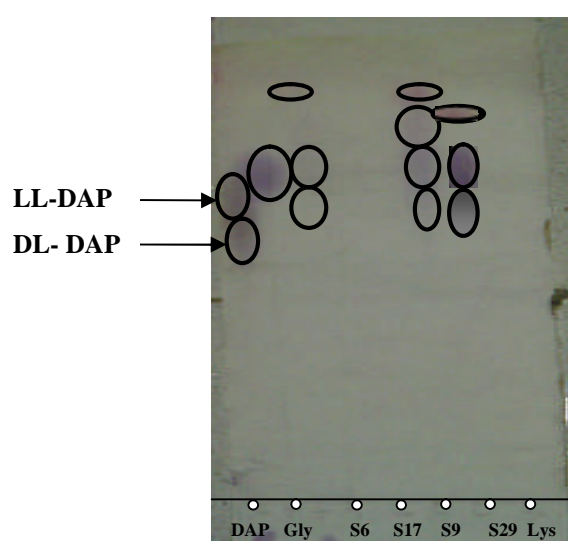
Tableau XIV : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat S₁₇, par chromatographie sur papier.

Isolat S17				
Constituants cellulaires	Couleur des taches	Rapport frontal (RF)	Réactif de détection	Identification des composés cellulaires
Acides aminés	ND	ND	Ninhydrine	ND
Sucres	Tache brune (marron clair)	Rf= 0,83	Diphenylamine-aniline	Glucose

Note : ND : non déterminé

Tableau XV : Analyse des constituants cellulaires pariétaux de l'isolat S₂₉, par chromatographie sur papier.

Isolat S29				
Constituants cellulaires	Couleur des taches	Rapport frontal (RF)	Réactif de détection	Identification des composés cellulaires
Acides aminés	-Tache violette -Tache brune virant au jaune	Rf= 0,69 Rf= 0,55	Ninhydrine	Glycine Acide LL-diaminopimélique
Sucres	-Tache brune (marron clair)	Rf= 0,83	Diphenylamine-aniline	Glucose

**Figure 29**: Caractérisation des sucres pariétaux pour les isolats S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉**Figure 30**: Détermination des acides aminés pariétaux pour les isolats S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉

1.3 Identification du genre

✚ Isolat S₆

Sur la base des caractères morphologiques : présence de mycélium aérien, présence de sporophores mono ou biverticillés à spores non mobiles et, chimiques : présence de l'acide diaminopimélique sous sa forme LL avec présence de la glycine, cet isolat présente une paroi de **type I (Lechevalier et Lechevalier, 1970a)**.

L'hydrolyse cellulaire par H₂SO₄ n'a permis de révéler aucun sucre caractéristique à part le glucose ce qui correspond au **chimiotype IC**.

Ces caractéristiques suggèrent l'appartenance de l'isolat S₆ au genre *Streptoverticillium*.

✚ Isolats S₉, S₁₇ et S₂₉

La présence chez les trois isolats de l'acide diaminopimélique sous sa forme LL avec la glycine comme acide aminé correspond à la paroi de **type I (Lechevalier et Lechevalier, 1970a)**.

L'absence de sucres caractéristiques permet de rattacher les isolats au **chimiotype IC**.

Les caractéristiques morphologiques et chimiques permettent d'affirmer clairement que les isolats S₉, S₁₇ et S₂₉ appartiennent au genre *Streptomyces*.

2. Détermination de l'espèce

2.1. Étude physiologique

Les tableaux (XVI et XVII) illustrent les résultats des tests physiologiques réalisés sur les isolats S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉.

Des différences dans l'utilisation des composés organiques ainsi que certaines spécificités physiologiques sont notées.

Les figures (31, 32, 33 et 34) présentent les courbes de croissance des quatre isolats sur les milieux Williams modifié à différentes valeurs de pH (5, 7, 9 et 11). Les mesures d'absorbances ont été effectuées à des longueurs d'ondes spécifiques pour chaque souche et cela après avoir effectué un balayage. Ainsi, les absorbances de l'isolat S₆ ont été effectuées à une longueur d'onde de 663 nm alors que les absorbances des isolats S₉, S₁₇ et S₂₉ ont été mesurés respectivement à 468 nm, 604 nm et 632 nm.

✚ Isolat S₆

L'isolat S₆ utilise la gélatine, la tyrosine, le tween 80, le glucose, le saccharose, le mannitol et le mannose, tandis que les autres substrats carbonés (galactose, lactose, arabinose, sorbitol, raffinose et ribose) ne permettent que le développement du mycélium du substrat.

La souche est résistante à la pénicilline (10U), antibiotique interférant dans la synthèse du peptidoglycane et est modérément résistante à l'oxytetracycline (30 µg) avec un diamètre d'inhibition de 13 mm.

L'isolat S₆ ne dégrade pas l'amidon, la caséine, le maltose, le xylose et l'oxalate de sodium. Les pigments mélanoïdes sont produits sur milieu ISP7 et aucune croissance n'est observée à 45°C. Cependant, la souche est capable de se développer à des concentrations importantes en NaCl atteignant 4M soit 250g/l. La croissance optimale a été enregistrée à 1,2M (75 g/l).

La figure 31 présente la cinétique de croissance de la souche S₆ à différentes valeurs de pH (5, 7, 9 et 11) sur milieu Williams modifié liquide mesurée à 663 nm.

Les sept premiers jours, l'isolat S₆ présente une croissance plutôt faible pour les quatre valeurs de pH (5, 7, 9 et 11 avec des DO ne dépassant pas 0,4). A partir du huitième jour, les densités optiques des cultures (mesurées à 663 nm) augmentent de façon brusque pour les cultures aux pH 5, 7 et 9.

A partir du 9^{ème} jour, la culture à pH 5 a connu une croissance rapide pour atteindre une DO de 1,6 au dernier jour de culture. A pH 7, la croissance augmente légèrement. Le milieu à pH 9 n'a pas permis un développement important des cellules, même après 21 jours d'incubation. [DO pratiquement constante (inférieure à 0,4)]. Enfin, sur le milieu à pH 11 le développement et la croissance de l'isolat S₆ étaient impossibles, chose qui a également été constatée sur milieu solide.

Tableau XVI : Caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'isolat S₆

Tests	Réactions	Tests	Réactions
Production de pigment mélanoïde	+	Croissance à :	Après 21 jours d'incubation
Production de nitrate réductase	+	28°C	+++
Dégradation de :		30°C	+++
Amidon	-	37°C	+++
Gélatine	+	40°C	++
Caséine	-	45°C	-
Tyrosine	+	pH 5	++
Tween 80	+	pH 7	+++
Glucose	+++	pH 9	+
Galactose	+/- (MS)	pH 11	+
Saccharose	+++	Mesure du pH après 21 jours d'incubation	
Lactose	+/- (MS)	Jour 1	J₁+ 20
Mannitol	+++	pH 5	6
Mannose	+++	pH 7	6,6
Maltose	-	pH 9	6,8
Arabinose	+/- (MS)	pH 11	7,3
Xylose	-	Résistance aux antibiotiques : diamètre	des zones d'inhibition (mm)
Sorbitol	+/- (MS)	Vancomycine V30 : (30µg)	40
Raffinose	+/- (MS)	Tobramycine TOB10 : (10µg)	30
Ribose	+/- (MS)	Tétracycline TE 30 : (30 µg)	20
Décarboxylation des sels de sodium :		Pénicilline P10 : (10 U)	R
Acétate	+	Spiramicine SP 100 : (100 µg)	40
Citrate	+	Erythromycine E 15 : (15 µg)	28
Oxalate	-	Oxytétracycline T 30 : (30 µg)	13
Croissance en présence de :		Bacitracine B 10 (10 U)	25
NaCl 1M	+++		
NaCl 1,2M	+++		
NaCl 1,4M	+++		
NaCl 1,6M	++		
NaCl 1,8M	++		
NaCl 2M	++		
NaCl 2,5M	++		
NaCl 3M	++		
NaCl 3,5M	+		
NaCl 4M	+		
Tellurite de K(0,01%)	+		
Tellurite de K(0,05%)	+		
Phénol (0,005%)	+		

Note : +, test positif ; -, test négatif; ND, non déterminé; R, résistant

+++ : Très bon développement

++ : Bon développement

+ : Développement moyen

+/- : Développement du mycélium du substrat (MS) uniquement

- : Absence de développement

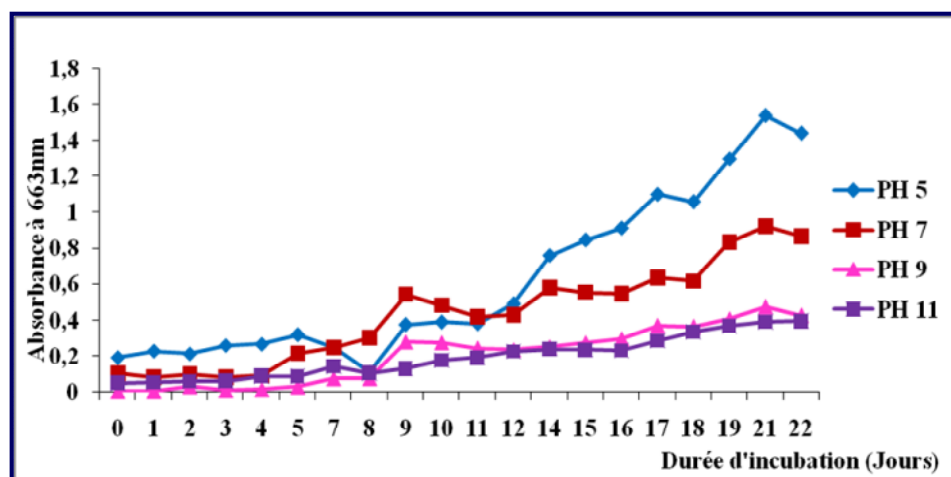


Figure 31 : Courbe de croissance de l'isolat S₆ sur milieu Williams modifié liquide à 28°C et à différentes valeurs de pH.

✚ Isolat S₉

La souche S₉ utilise un certain nombre de composés organiques tels que l'amidon, la gélatine, la tyrosine, le glucose, le galactose, le saccharose, le mannitol, le mannose, l'arabinose, le xylose et le raffinose. Le lactose permet uniquement le développement du mycélium du substrat.

L'isolat S₉ ne dégrade pas la caséine, le tween 80, le maltose, le sorbitol, le ribose et l'oxalate de sodium. Les pigments mélanoides ne sont pas produits et aucune croissance n'est observée à 45°C. Il est capable de se développer à des concentrations importantes en NaCl qui peuvent atteindre 2,5M avec un optimum de croissance entre 1,4 et 1,6 M (75 g/l).

La cinétique de croissance de l'isolat S₉ mesurées à 468 nm sur milieu Williams modifié à différentes valeurs de pH est présentée dans la figure (32).

La souche S₉ présente une bonne croissance sur les milieux à pH 7, 9 et 11, où les densités optiques augmentent dès le 5^{ème} jour et ce jusqu'au 14^{ème} jour, pour rester constantes jusqu'en fin de culture. A pH 5, la croissance était faible même après 21 jours d'incubation, la DO est restée relativement constante. Ces résultats rejoignent ceux obtenus avec les milieux solides où la croissance est très faible (présence d'un mycélium de substrat uniquement).

✚ Isolat S₁₇

L'isolat S₁₇ est capable d'utiliser de nombreux composés organiques comme l'amidon, la gélatine, la tyrosine, le glucose, le galactose, le saccharose, le mannose, le maltose, le xylose ainsi que le mannitol. Cependant, il est incapable de dégrader la caséine, le tween 80, le lactose,

l'arabinose, le raffinose, le ribose et l'oxalate de sodium. Les pigments mélanoides sont produits sur milieu ISP7.

Aucune croissance n'a été observée à 45°C et en présence de phénol, cependant, la souche est capable de se développer à des concentrations importantes en NaCl atteignant 3M.

La croissance optimale a été enregistrée à 1,4M (75 g/l).

L'isolat s'est révélé sensible à tous les antibiotiques testés à part la pénicilline (10U), qui est un antibiotique qui interfère avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane. (**Cavallo et al., 2004**).

Les cinétiques de croissance sur milieu Williams mesurées à 604 nm permettent de déduire que la souche S₁₇ présente une meilleure croissance à pH 9 où la DO n'a cessé d'augmenter dès le premier jour pour atteindre une valeur constante (1,2) au 15^{ème} jour d'incubation.

A l'opposé, la culture à pH 5 a présenté une croissance très faible même après 21 jours d'incubation. En effet, la DO est restée relativement constante. Par ailleurs, la croissance sur le milieu à pH 11 n'a débutée qu'à partir du 9^{ème} jour d'incubation pour atteindre une DO de (1,2) au 20^{ème} jour.

Isolat S₂₉

L'isolat S₂₉ utilise la gélatine, la tyrosine, le tween 80, le glucose, le galactose, le saccharose et le maltose, le lactose, le mannose et l'oxalate de sodium ne permettent que le développement du mycélium du substrat. L'amidon, la caséine, le mannitol, le sorbitol et le raffinose ne sont pas dégradés. La souche est résistante à la pénicilline et sensible à tous les antibiotiques testés, produit des pigments mélanoides, cependant aucun développement n'est observé à 45°C ni à pH 9 ni à pH 11.

Les cinétiques de croissance de la souche S₂₉ à 632 nm permettent de déduire que cet isolat présente un meilleur développement à pH 7 où la DO augmente légèrement dès le 4^{ème} jour d'incubation. Alors que les cultures à pH 5, 9 et 11 ont présenté des croissances relativement faibles.

La mesure des pH initiaux au début de l'incubation (1^{er} jour) et finaux des milieux (après 21 jours) des quatre souches étudiées, nous a permis de déduire que ces dernières tendent vers une neutralisation et une faible acidification de leurs milieux et cela pour toute les valeurs de pH testées. (tableau XVII). Ces résultats sont en accord avec ceux établis par **Boughachiche et al.**(2005), qui confirme l'abondance des actinomycètes dans les milieux faiblement acides, suite à un isolement réalisé à partir d'un environnement salin, la « Sebka » de Ain Mlila.

Tableau XVII: Caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats **S9**, **S17**, et **S29** [*Streptomyces*]

Tests	Réactions			Tests	Réactions		
	S9	S17	S29		S9	S17	S29
Production de pigment mélanoïde	-	-	-	Croissance à	Après 21 jours d'incubation		
Production de nitrate réductase	+	+	+	28°C	+++	+++	+++
Dégradation de :				30°C	+++	+++	+++
Amidon	+	+	+	37°C	+++	+++	+++
Gélatine	+	+	+	40°C	+	+	+
Caséine	-	-	-	45°C	-	-	-
Tyrosine	+	+	+	pH 5	+	+++	+++
Tween 80	-	-	+	pH 7	+++	+++	++
Glucose	+++	+++	+++	pH 9	+++	++	-
Galactose	+++	+++	+++	pH 11	+++	++	-
Saccharose	+++	+++	+++	Jour 1	J₁+ 20		
Lactose	+/-	-	+/-	pH 5	5,7	6,1	5,7
Mannitol	+++	++	-	pH 7	6,7	6,8	6,8
Mannose	+++	+++	+/-	pH 9	6,5	6,9	6,6
Maltose	-	+++	+++	pH 11	7,3	7,3	7
Arabinose	+++	-	ND	Résistance aux antibiotiques : diamètre	des zones d'inhibition (mm)		
Xylose	+++	+++	ND	Vancomycine V30	35	25	25
Sorbitol	-	+/-	-	Tobramycine TOB10	22	23	28
Raffinose	+++	-	-	Tétracycline T30	36	22	35
Ribose	-	-	ND	Pénicilline P10	R	R	R
Décarboxylation des sels de sodium :				Spiramicine SP100	21	30	30
Acétate	+	+	+	Erythromycine E15	20	30	30
Citrate	+	+	+	Oxytétracycline T30	30	35	30
Oxalate	-	-	+/-	Bacitracine B10	20	21	30
Croissance en présence de :							
NaCl 1M	+++	+++	+++				
NaCl 1,2M	+++	+++	+++				
NaCl 1,4M	+++	+++	++				
NaCl 1,6M	+++	++	+				
NaCl 1,8M	+	++	+				
NaCl 2M	+	+	+				
NaCl 2,5M	+	+	+/-				
NaCl 3M	+/-	+	+/-				
NaCl 3,5M	+/-	+/-	+/-				
NaCl 4M	+/-	+/-	-				
Tellurite de K (0,01%)	+	-	+				
Tellurite de K (0,05%)	+	-	+				
Phénol (0,005%)	+	-	+/-				

Note. +, test positif ; -, test négatif ; ND, test non déterminé ; R, résistant.

+++ : Très bon développement

++ : Bon développement

+ : Développement moyen

+/- : Développement du mycélium du substrat (MS) uniquement - : Absence de développement

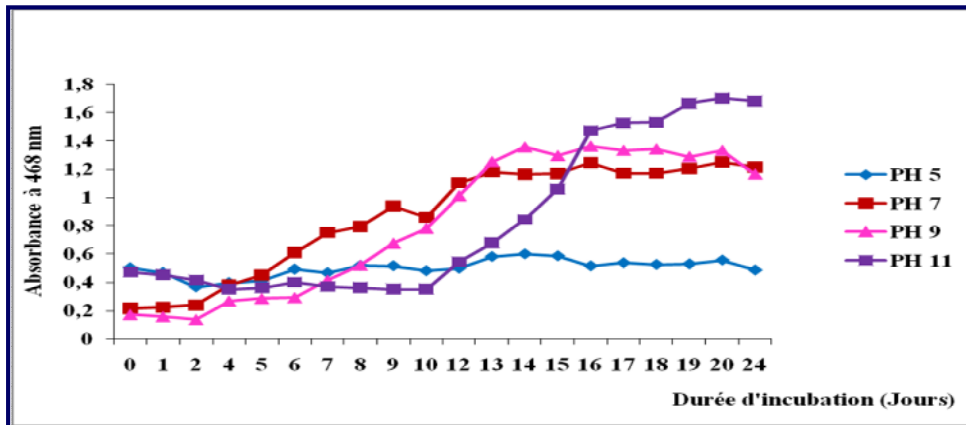


Figure 32 : Courbe de croissance de l'isolat S₉ sur milieu liquide Williams modifié à 28°C et à différentes valeurs de pH

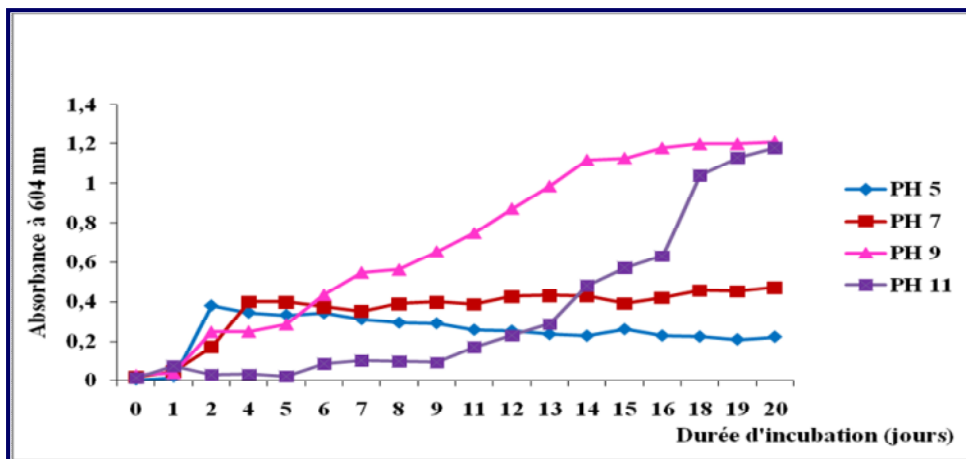


Figure 33 : Courbe de croissance de l'isolat S₁₇ sur milieu liquide Williams modifié à 28°C et à différentes valeurs de pH

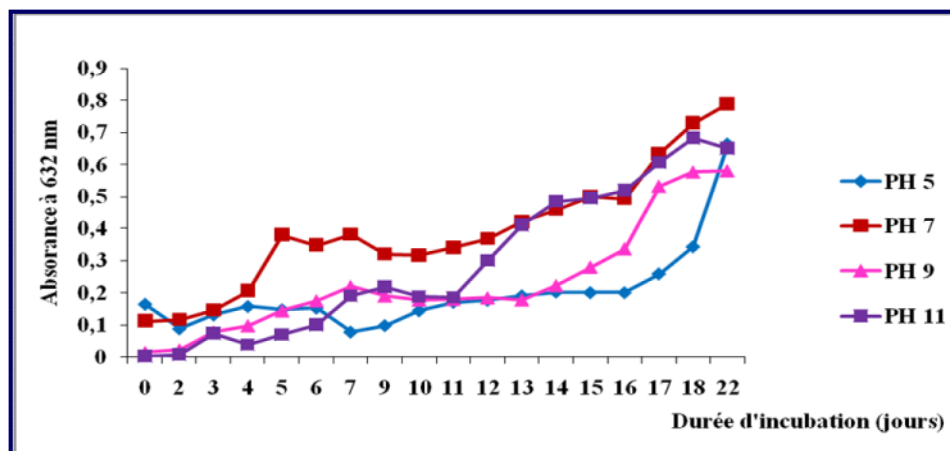


Figure 34 : Courbe de croissance de l'isolat S₂₉ sur milieu liquide Williams modifié à 28°C et à différentes valeurs de pH

Actuellement, la détermination de nouvelles espèces de microorganismes s'effectue non seulement par des méthodes phénotypiques (études morphologique et physiologique) mais aussi par des critères chimiques (chimiotaxonomie) et des critères moléculaires qui s'avèrent être essentiels. Ainsi, nos quatre isolats ont fait l'objet d'une étude morphologique, chimique et physiologique (limitée). Il est donc impossible de confirmer l'espèce pour tous les isolats, à ce stade de l'étude.

IV. Production, extraction et caractérisation partielle des substances actives synthétisées.

1. Production d'antibiotiques en milieu liquide

Les cultures en erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu Williams modifié liquide des quatre isolats sélectionnés, ont fait objet de l'extraction et de la purification des antibiotiques synthétisés.

Le milieu Williams modifié contient 1g/l de glucose, cette source de carbone rapidement assimilable est connue comme étant un excellent stimulant de la croissance microbienne (**Hermans et al., 1989**) et sa concentration est déterminante pour la production d'antibiotiques. En effet, pour de nombreux microorganismes, elle exerce à haute concentration, une action négative sur la synthèse d'antibiotiques (répression catabolique glucidique ou effet glucose). **Larpen et Sanglier, (1989)** rapportent que les fortes concentrations de glucose ou d'autres sources carbonées facilement assimilables sont généralement défavorables à la production.

Le glucose a été additionné au départ pour permettre aux souches de croître activement avant de passer à la phase de production où elles consommeront l'amidon (**Hermans et al., 1989**).

2. Extraction et purification des antibiotiques

L'extraction des antibiotiques à partir du milieu est effectuée après la mise en évidence de l'activité antibiotique avec la méthode des cylindres d'agar. En effet, après dix jours d'incubation des souches, l'activité obtenue vis-à-vis de divers germes test est très importante donc optimale.

De tels résultats ont également été rapportés par **Sejiny, (1991)**, où il a déterminé le coefficient de corrélation entre le temps d'incubation et le diamètre des zones d'inhibition. En effet, il a ainsi déduit qu'un temps d'incubation de 10 jours permettait d'avoir des zones d'inhibition importante. Et d'une manière générale, les premiers jours (4-7 jours) d'incubations sont caractérisés par la formation de biomasse alors que la production maximale d'antibiotiques est enregistrée durant la phase stationnaire de la croissance (**Sejiny, 1991**).

La première phase de croissance (trophophase) est caractérisée par une croissance rapide (production de biomasse), tandis que la seconde phase (idiophase) est caractérisée par une croissance lente et une production maximale des antibiotiques (**Sejiny, 1991 ; Pirt et Righelato, 1967 et Lurie et al., 1975**).

La production d'antibiotiques des souches S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉ est très importante sur le milieu Williams gélosé utilisé. Il faut signaler, toutefois, que nous nous sommes limité à ce milieu car il nous a permis d'avoir une production acceptable d'antibiotiques.

Une étude d'optimisation des milieux de production devra être menée s'il s'avère que les antibiotiques produits sont nouveaux bien qu'elle soit longue et délicate à mener.

De nombreuses études d'optimisation ont été effectuées, telles celles menées par **Badji et al.** (2006), au cours de laquelle 8 milieux de culture ont été testés. Parmi lesquels figure le milieu Williams (amidon-caseine-agar). Dans leur cas, le taux de production le plus important a été observé sur milieu ISP2.

En 2005, la même équipe a également effectué une optimisation de la production en testant 5 milieux différents pour en conclure à l'efficacité du milieu GYEA.

Cette extraction est réalisée à partir des filtrats et du mycélium pour révéler aussi bien les antibiotiques extracellulaires qu'intracellulaires.

2.1. Choix du solvant d'extraction des antibiotiques

2.1.1. Extraction à partir du filtrat de culture

Cinq solvants de polarités différentes (*n*-hexane, benzène, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont utilisés pour l'extraction des activités antibiotiques.

Des aliquotes de 100 ml de filtrat de culture sont extraits chacun par un volume égal de solvant.

Les extraits organiques sont concentrés à sec dans un Rotavapor à 40°C puis récupérés dans 5 ml de méthanol pour être testés par la méthode des puits (50µl par puits) vis à vis de *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus niger*, *Fusarium polyferatum* et *Candida albicans*. Ne sont testées que les phases organiques.

Les résultats des activités antibiotiques déterminées par antibiographie sont représentés dans les figures (35, 36, 37 et 38).

Les quatre isolats S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉ possèdent des activités antifongiques, antilevuriennes et antibactériennes intéressantes. L'activité antibactérienne est dirigée particulièrement vis-à-vis des bactéries à Gram positif, confirmant ainsi les activités obtenues sur milieu solide par la méthode des cylindres d'agar.

Les activités antibiotiques des extraits organiques des isolats testés sont décelées dans pratiquement toutes les phases organiques des cinq solvants : *n*-hexane, benzène, dichlorométhane (DM), acétate d'éthyl (AE) et *n*-butanol. Elles sont néanmoins plus ou moins importantes en fonction du solvant organique utilisé, ce qui suppose que les activités antimicrobiennes mesurées par antibiographie résultent d'un plus grand nombre de molécules ayant des structures différentes (polaires, de polarité moyenne ou apolaires).

🚩 Activité antibiotique de l'isolat S₆

Concernant l'isolat S₆, la figure (35) montre que les activités antibiotiques ont été obtenues avec des solvants différents. En effet, les activités antibactériennes contre les trois germes cibles l'ont été avec l'extrait au dichlorométhane.

Les extraits au *n*-butanol et à l'acétate d'éthyle n'ont révélé d'activité que vis-à-vis de *B. subtilis* et *S. aureus*. Le benzène a permis d'extraire les activités anti *S. aureus* et anti *M. luteus*.

Enfin, l'extrait à l'hexane n'a montré qu'une activité contre *M. luteus* et *B. subtilis*.

C'est le dichlorométhane qui a donné les meilleurs résultats, il a donc été retenu comme solvant d'extraction pour la suite de l'étude. Les activités antifongiques ont été obtenues avec l'extrait au *n*-butanol et au dichlorométhane vis-à-vis des deux champignons filamenteux testés mais également contre *C. albicans*. Le *n*-butanol a été retenu pour la suite de l'étude des activités antifongiques afin de réaliser une extraction sélective des activités antimicrobiennes par rapport au dichlorométhane.

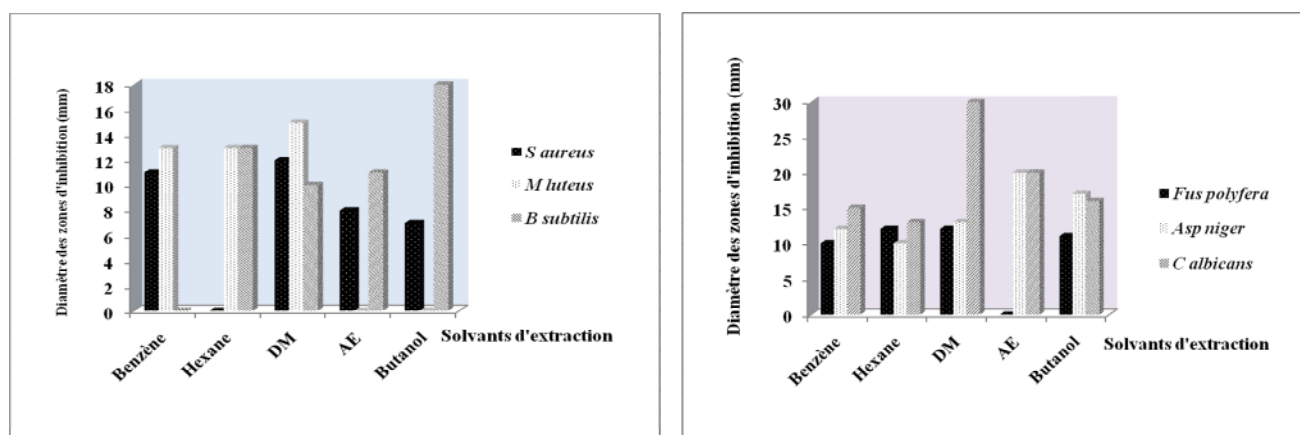


Figure 35: Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat S₆ en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de bactéries et champignons cibles.



Figure 35:- a- antibiogramme de la souche S_6 vis-à-vis de *M. luteus*

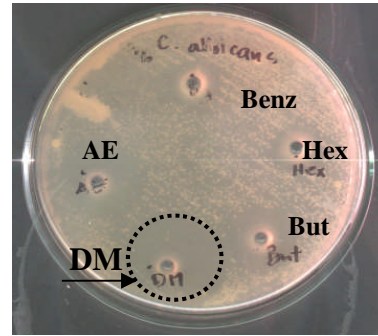


Figure 35 :- b- antibiogramme de la souche S_6 vis-à-vis de *C. albicans*

Figure 35 bis: Antibiogramme de la souche S_6 vis-à-vis de deux germes cibles : *M. luteus* (35a) et *C. albicans* (35b).

🌈 Activité antibiotique de l'isolat S_9

La figure (36) illustrant les activités antibiotiques des extraits organiques de l'isolat S_9 présente des différences remarquables. En effet, la meilleure activité a été obtenue avec le dichlorométhane et la moins bonne avec l'acétate d'éthyle et le benzène contre les bactéries.

Le *n*-butanol, lui, a permis d'avoir de meilleurs résultats pour l'activité antifongique.

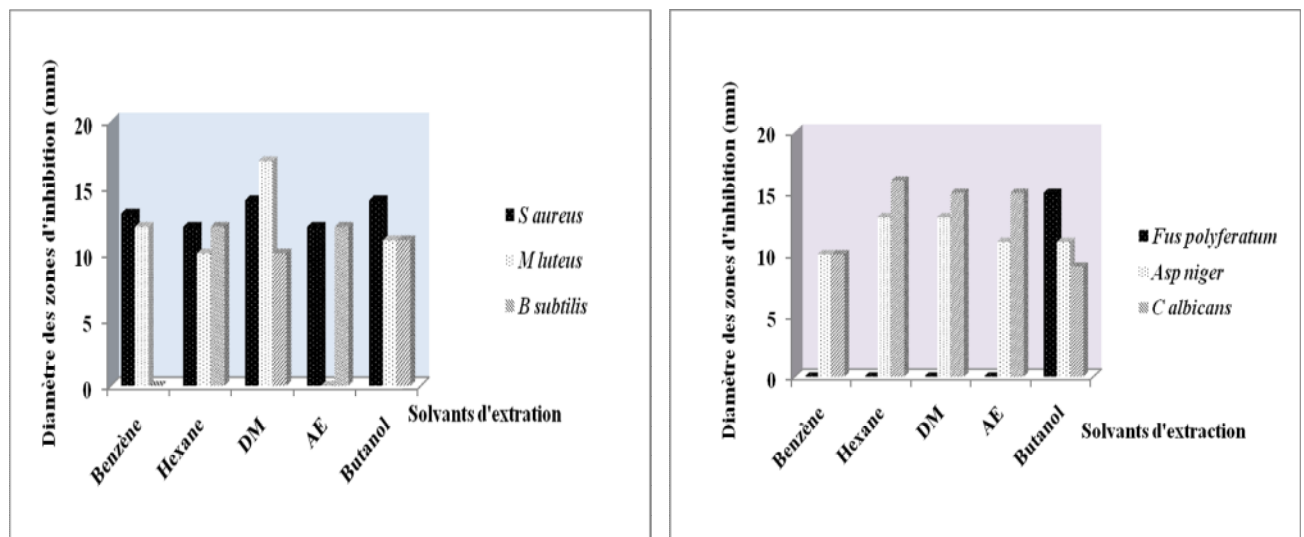


Figure 36: Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat S_9 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de bactéries et champignons cibles.

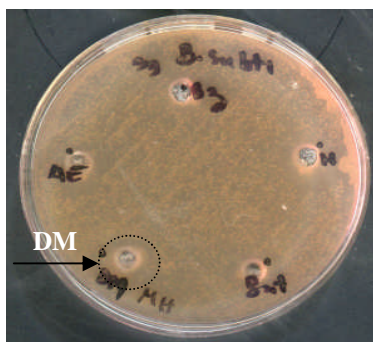


Figure 36 :- a- antibiogramme de la souche S9 vis-à-vis de *B. subtilis*

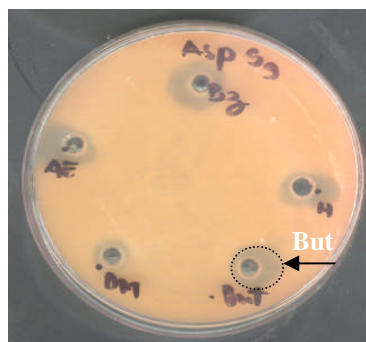


Figure 36 :- b- antibiogramme de la souche S9 vis-à-vis d'*Asp. niger*

Figure 36 bis: Antibiogramme de la souche S₉ vis-à-vis de deux germes cibles : *B. subtilis* (36a) et *Asp. niger* (36b).

📊 Activité antibiotique de l'isolat S₁₇

La figure (37) présente les activités antibactériennes et antifongiques de l'isolat S₁₇, extraites avec des solvants différents. Les activités antibactériennes vis-à-vis des trois germes testés sont obtenues dans l'extrait à l'hexane, alors que le *n*-butanol a permis d'avoir les meilleures activités antifongiques.

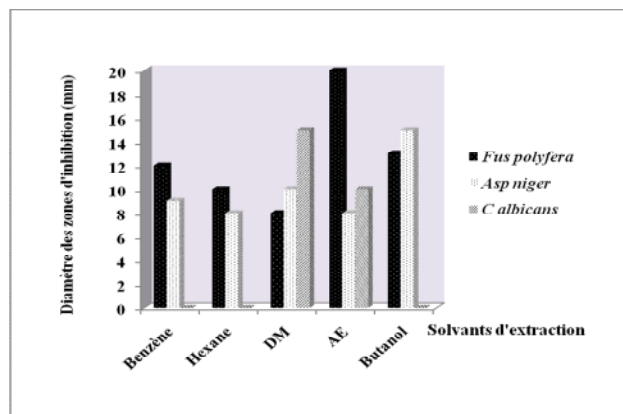
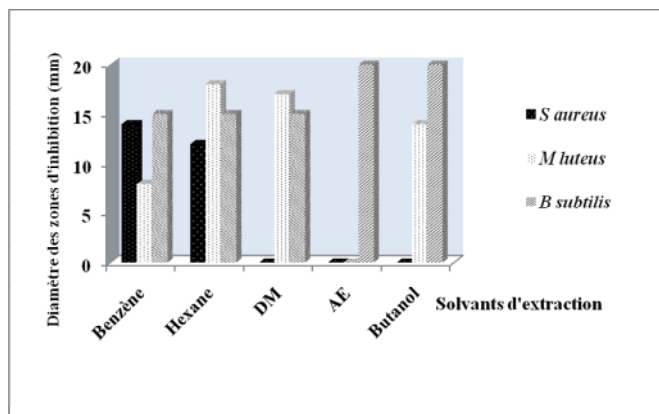


Figure 37: Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat S₁₇ en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de bactéries et champignons cibles.



Figure 37 bis : antibiogramme de la souche S₁₇ vis-à-vis de *C. albicans*

🚩 Activité antibiotique de l'isolat S₂₉

Enfin, la figure (38) montre que les activités antibiotiques contre tous les germes-cibles testés sont obtenues avec le benzène. L'extrait à l'hexane ne contient que des activités contre *S. aureus* et *Asp. niger*.

L'acétate d'éthyle et le *n*-butanol n'ont extrait que des activités contre *Asp. niger*.

Pour la suite; le benzène qui a donné les meilleurs résultats, a été retenu comme solvant d'extraction pour les filtrats de culture de l'isolat S₂₉.

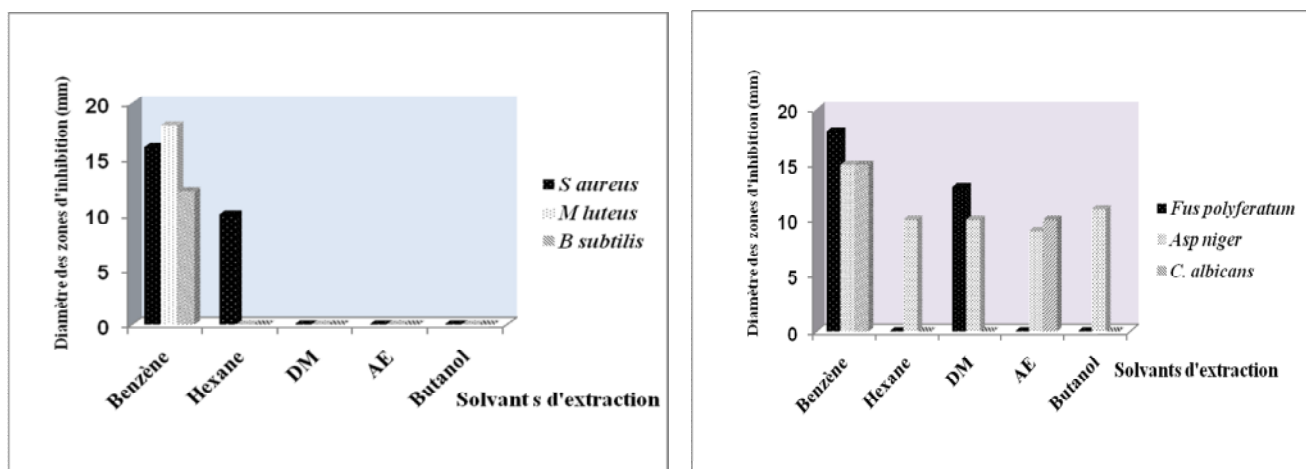


Figure 38: Activité antibiotique des extraits organiques de l'isolat S₂₉ en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de bactéries et champignons cibles.

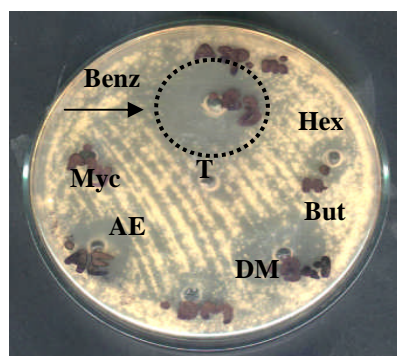


Figure 38 :- a- antibiogramme de la souche S₂₉ vis-à-vis d'*Asp. niger*

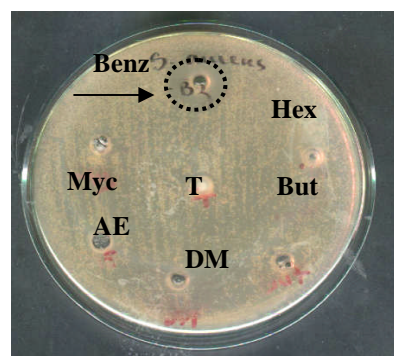


Figure 38 :- b- antibiogramme de la souche S₂₉ vis-à-vis de *S. aureus*

Figure 38 bis: Antibiogramme de la souche S₂₉ vis-à-vis de deux germes cibles : *Asp. niger* (38a) et *S. aureus* (38b).

Les extraits bruts au dichlorométhane des isolats S₆ et S₉, ainsi qu'à l'hexane et au benzène des souches S₁₇ et S₂₉, ont montré des activités antibactériennes importantes vis-à-vis des bactéries à Gram positif.

Il en est de même pour les extraits butanoliques bruts des isolats S₆, S₉ et S₁₇ et de l'extrait benzénique brut de la souche S₂₉ contre les champignons filamenteux testés.

Ainsi, la plupart des activités antifongiques ont été récupérées et extraits de façon optimale par le *n*-butanol pour les souches S₆, S₉ et S₁₇ et par le benzène pour l'isolat S₂₉. Selon **Franco et Countinho**, (1991) et **Augustine et al.** (2005), la plupart des antibiotiques antifongiques connus à ce jour, sont surtout extraits par l'acétate d'éthyle.

Des études traitant sur le choix du solvant d'extraction des substances actives de souches actinomycetales, sur le genre *Actinomadura* menées par **Badji et al.** (2006), ont aboutis à la récupération des activités antibiotiques par le benzène ;

De nombreux travaux ont confirmé l'efficacité du butanol par rapport aux autres solvants utilisés, entre autres, celle réalisée par **Boudjella et al.** (2006) sur le genre *Streptosporangium* qui indique, clairement, que le solvant le plus approprié pour l'extraction des substances actives était le *n*-butanol.

Zitouni et al. (2005), ont obtenu des taux d'extraction importants avec le *n*-butanol et le dichlorométhane sur le genre *Saccharothrix*. Par contre, pour le genre *Nocardiosis*, le *n*-butanol et l'acétate d'éthyle étaient les plus efficaces.

Enfin, **Augustine et al.** (2005), ont obtenu de meilleures activités vis-à-vis de champignons filamenteux en utilisant l'hexane comme solvant d'extraction en utilisant l'espèce *Streptomyces albidoflavus*.

2.1.2. Extraction à partir du mycélium

Dans l'extrait méthanolique du mycélium, les activités contre tous les germes cibles utilisés sont absentes.

2.2. Mise en évidence des antibiotiques par bioautographie

2.2.1. Détection et semi-purification des antibiotiques

Les activités antibiotiques sont d'abord détectées sur plaque de gel de silice. Les phases organiques actives ayant montrés les meilleures activités antibiotiques sont analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice (0,25 mm d'épaisseur).

2.2.1.1. Développement des plaques et sélection du système d'élution

Les extraits au dichlorométhane et au *n*-butanol pour les isolats S₆ et S₉ ;
-les extraits à l'hexane et au butanol pour la souche S₁₇ ;
-l'extrait au benzène pour l'isolat S₂₉,
ont été sélectionnés sur la base des résultats de l'antibiographie réalisée précédemment.
Quatre systèmes d'élution avec des rapports différents ont été testés.

- ***n*- Butanol - Acide acétique - Eau (B.A.E)** (60 : 20 : 20) (v/v/v), [Temps de migration 3h].
- **Acétate d'éthyle – Méthanol (A.M)** : (100 : 15) (v/v), [Temps de migration 1h].
- **Ethanol – Ammoniaque – Eau (E.A.E)** : (80 : 10 : 10), (90 : 5 : 5), (60 : 20 : 20), (40 : 30 : 30) (v/v/v), [Temps de migration 2h30- 3h] et ;
- **Acétonitrile - Eau** : (30 : 70), (50 : 50) (v/v), [Temps de migration 50 min].

Les plaques sont observées sous lumière UV afin de localiser les taches présentant une absorbance à 254 nm et une fluorescence à 366 nm.

Le meilleur système d'élution sera sélectionné pour sa capacité à séparer les extraits bruts d'antibiotiques. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure (39).

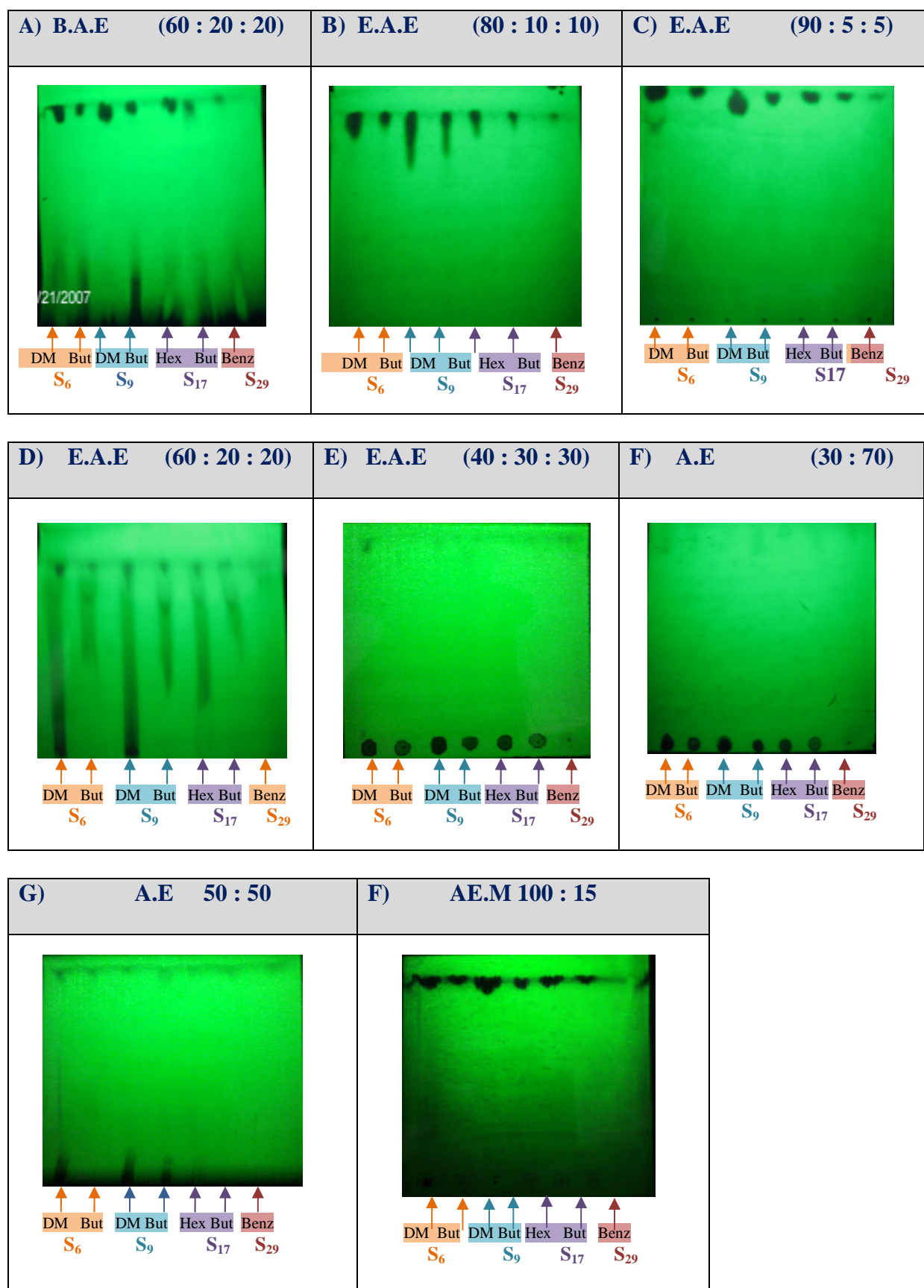


Figure 39 : Chromatographie sur couche mince (CCM) avec différents systèmes d'élution [sous lumière UV à 254 nm des extraits organiques des isolats S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉].

D'après la figure (39), il est évident que le meilleur système d'éluant ayant permis une bonne séparation, des constituants des extraits bruts des quatre isolats, est l'Ethanol-Ammoniaque-Eau (E.A.E) avec un rapport de (60 : 20 : 20 v/v/v).

En effet, avec certains des systèmes utilisés, les extraits sont : soit restés au point de spot [cas de l'acétonitrile / Eau (70 : 30. v/v) et de l'E.A.E (40 :30 :30. v/v/v)], ou alors ont migrés jusqu'au front du chromatogramme [cas de l'acétate d'éthyle/Méthanol (100 : 15. v/v) et de l' E.A.E (90 :5 :5. v/v/v)].

Le système (E.A.E) (60 : 20 : 20 v/v/v) a donné des taches de couleur violet foncé-bleu nuit à violet clair, formant des trainées continues sous forme de smear, tout au long de la distance de migration.

Séparation des activités produites par l'isolat S₆

Pour l'extrait au dichlorométhane de l'isolat S₆, le système éluant (E.A.E) (60 : 20 : 20 v/v/v) a permis de séparer et de distinguer 5 tâches de couleur différentes, (un dégradé du bleu nuit) dont les R_f sont respectivement (0,12 ; 0,58 ; 0,64 ; 0,88 et 0,97) à lumière UV (254 nm) et des taches fluorescentes plus restreintes sous forme de légères trainées à lumière UV (365 nm).

L'extrait au butanol du même isolat a donné trois taches distinctes à lumière UV 254 nm,

Par ailleurs 2 taches ont pu être observées sous lumière fluorescente à 365 nm.

Les R_f des tâches absorbant à 254 nm sont (0,64 ; 0,88 et 0,97).

Séparation des activités produites par l'isolat S₉

L'extrait au dichlorométhane de l'isolat S₉ a présenté 5 taches nettes ayant une couleur d'un dégradé de bleu nuit sous lumière UV à 254 nm à des rapports frontaux de 0,14 ; 0,60 ; 0,70 ; 0,81 et 0,95 respectivement et 3 taches avec un long « smear » fluorescent observés sous lumière UV à 365 nm. L'extrait au butanol a permis l'observation de 3 taches presque similaires à celle de l'isolat S₆ (sachant que les isolats ont été obtenus à partir d'un même environnement).

Séparation des activités produites par l'isolat S₁₇

Le E.A.E (60 :20 :20) a permis de distinguer 4 tâches de couleur différentes pour l'extrait à l'hexane sous lumière UV à 254 nm avec des R_f de (0,60 ; 0,80 ; 0,93 et 0,97) et 3 tâches pour l'extrait au butanol caractérisées pour les deux premières par un dégradé de bleu nuit et une troisième tache de couleur blanche de R_f (0,89).

Séparation des activités produites par l'isolat S₂₉

L'extrait au benzène de l'isolat S₂₉ a présenté 2 taches distinctes de R_f proches (0,93 et 0,97) de couleurs claires observées sous lumière UV à 254 nm, tandis qu'aucune tache fluorescente n'a été décelée à 365 nm.

2.2.2. Bioautographie

Après avoir sélectionné les solvants d'extraction ayant permis une meilleure récupération des activités antibiotiques par antibiographie, et après avoir procédé au choix du système d'élution qui permet une bonne séparation des substances présentes dans les extraits bruts à savoir l'Ethanol/Ammoniaque/Eau (60/20/20 v/v/v); les phases organiques sont analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les antibiotiques sont détectés par bioautographie contre *Micrococcus luteus*.

Bien que la migration des substances soit bonne, il a été néanmoins impossible de distinguer l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis du germe test utilisé et cela malgré le nombre de répétition (3).

Cela s'explique, très probablement, par la faible quantité d'antibiotiques produite. En effet, la production a été réalisée dans un volume de 100 ml seulement et une bonne partie des substances actives a été perdue durant les étapes successives d'extraction.

3. Caractérisation partielle des extraits bruts d'antibiotiques

3.1. Révélations chimiques

Suite à la sélection du meilleur système de migration, d'autres plaques de gel de silice sont développées dans les mêmes conditions dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des antibiotiques produits.

La surface des plaques est alors pulvérisée avec différents révélateurs chimiques.

Révélation chimique des activités antimicrobiennes produites par l'isolat S₆

▪ Extraits au dichlorométhane

Des révélations positives ont été obtenues par les réactifs suivants :

- Diphénylamine-aniline : (révélateur des glucides) ;
- La vanilline -H₂SO₄ : (révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées) ;

- Réactif de Dragendorff : (révélateur des alcaloïdes et des hétérocycles) ;
- La ninhydrine : révélateur des amines, des acides aminés et des osamines.

Les autres révélateurs chimiques utilisés, c'est-à-dire, le chlorure de fer ferrique (révélateur des phénols et des acides hydroxamiques), le formaldéhyde- H_2SO_4 (révélateur des aromatiques polycycliques) et le réactif de Tollens (révélateur des substances réductrices) ont donné des réactions négatives avec l'extrait au dichlorométhane de l'isolat S_6

▪ Extraits au *n*-butanol

Des révélations positives ont été obtenues avec le diphénylamine-aniline ; la vanilline – H_2SO_4 dont trois tâches de couleurs et de Rf différents (gris, blanc et bleu nuit).

Ces résultats suggèrent que les extraits au dichlorométhane et au *n*-butanol de l'isolat S_6 contiennent un ou plusieurs sucres. La présence d'alcaloïdes ou hétérocycles de fonctions amine de stéroïdes d'huiles étherées ou d'alcools supérieurs n'est pas exclue.

En revanche, cela suppose l'absence de phénols et d'acides hydroxamiques, de molécules aromatiques polycycliques et de substances réductrices.

🚩 Révélation chimique des activités antimicrobiennes produites par l'isolat S_9

▪ Extrait au dichlorométhane

L'extrait au dichlorométhane est révélé positivement par les réactifs suivants :

- Diphénylamine-aniline où 03 tâches de Rf différents ont été observées ;
- La vanilline – H_2SO_4 ;
- Réactif de Dragendorff et enfin
- La ninhydrine.

▪ Extrait au *n*-butanol

Les réactions étaient positives avec les mêmes révélateurs que pour l'extrait au dichlorométhane, toutefois avec des différences au niveau du nombre de taches observées. (figures 40 et 41) ainsi que leurs rapports frontaux.

Les tests sont négatifs pour les révélateurs restants à savoir, le chlorure de fer ferrique, le formaldéhyde- H_2SO_4 et le réactif de Tollens.

Ces résultats suggèrent que les extraits au dichlorométhane et au *n*-butanol de l'isolat S₉ contiennent un ou plusieurs sucres, présence d'alcaloïdes ou hétérocycles de fonctions amine de stéroïdes, d'huiles étherées et/ou encore d'alcools supérieurs.

En revanche, cela suppose l'absence de phénols et d'acides hydroxamiques, de molécules aromatiques polycycliques et de substances réductrices.

Révélation chimique des activités antimicrobiennes produites par l'isolat S₁₇

▪ **Extrait à l'hexane**

L'extrait à l'hexane s'est révélé positif au diphénylamine-aniline où 03 tâches sont observées, à la vanilline -H₂SO₄, observation de 08 tâches, au réactif de Dragendorff qui a permis la révélation d'1 tâche jaune orangé, et enfin la ninhydrine qui a révélé 1 tâche.

▪ **Extrait au *n*-butanol**

Les réactions sont positives pour les mêmes révélateurs que pour l'extrait à l'hexane avec des différences sur le nombre de tâches révélées.

Les autres révélateurs chimiques utilisés, c'est-à-dire, le chlorure de fer ferrique, le formaldéhyde-H₂SO₄ et le réactif de Tollens ont donné des réactions négatives, aussi, les réactions suggèrent la présence d'un ou plusieurs sucres d'alcools supérieurs de stéroïdes et des huiles étherées de fonctions amines d'alcaloïdes et, éventuellement, d'hétérocycles.

D'autre part cela suppose l'absence de phénols et d'acides hydroxamiques, de molécules aromatiques polycycliques et de substances réductrices.

Révélation chimique des activités antimicrobiennes produites par l'isolat S₂₉

▪ **Extrait au benzène**

L'extrait au benzène de l'isolat S₂₉ est révélé positivement par:
Le diphénylamine-aniline et la vanilline -H₂SO₄ : 2 taches.

Les cinq autres révélateurs testés, le réactif de Dragendorff, la ninhydrine, le chlorure de fer ferrique, le formaldéhyde-H₂SO₄ et le réactif de Tollens ont donné des réactions négatives.

Ces résultats suggèrent la présence de composés glucidiques de stéroïdes d'huiles étherées et/ou d'alcools supérieurs dans l'extrait au benzène de l'isolat S₂₉.

Les figures (40 et 41) montrent les réactions positives des extraits bruts des quatre isolats au diphénylamine-aniline et à la vanilline-H₂SO₄.

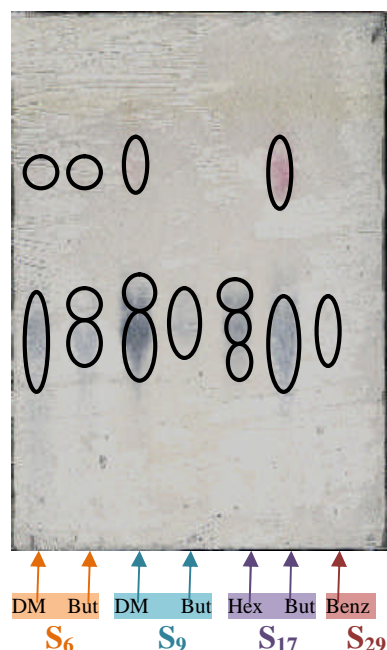


Figure 40: Plaqué de gel de silice révélée au diphénylamine-aniline à chaud. (E.A.E) (60/20/20. v/v/v) Extraits organiques des isolats S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉

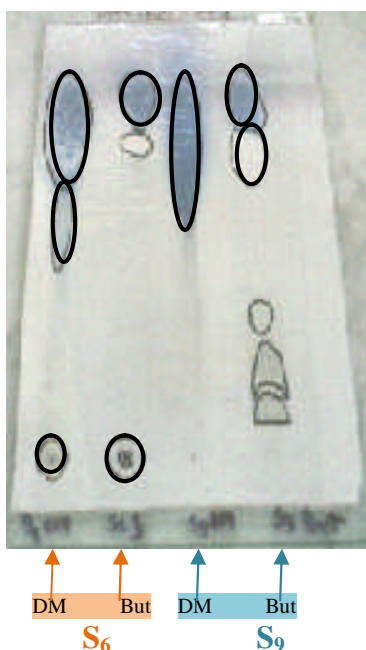


Figure 41 : Plaqué de gel de silice révélée à la vanilline -H₂SO₄ à chaud (E.A.E) (60/20/20. v/v/v) Extraits organiques des isolats S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉

Les tableaux (XVIII, XIX, XX et XXI) représentés en annexe N°(5) résument tous les détails de la révélation chimique des extraits bruts des 4 isolats étudiés.

3.2. Spectroscopie UV-visible

La recherche de composés polyéniques dans les extraits butanoliques bruts actifs des isolats étudiés est réalisée par spectrophotométrie UV-visible entre 190 nm et 500nm.

Les spectres UV-visible des extrais butanoliques, au dichlorométhane, à l'hexane et au benzène, bruts, sont présentés dans les figures (42, 43, 44 et 45).

Les polyènes sont connus pour leur toxicité et leur instabilité, et sont de ce fait écartés des programmes de recherche des nouveaux antifongiques (Dinya et Sztaricskai, 1986).

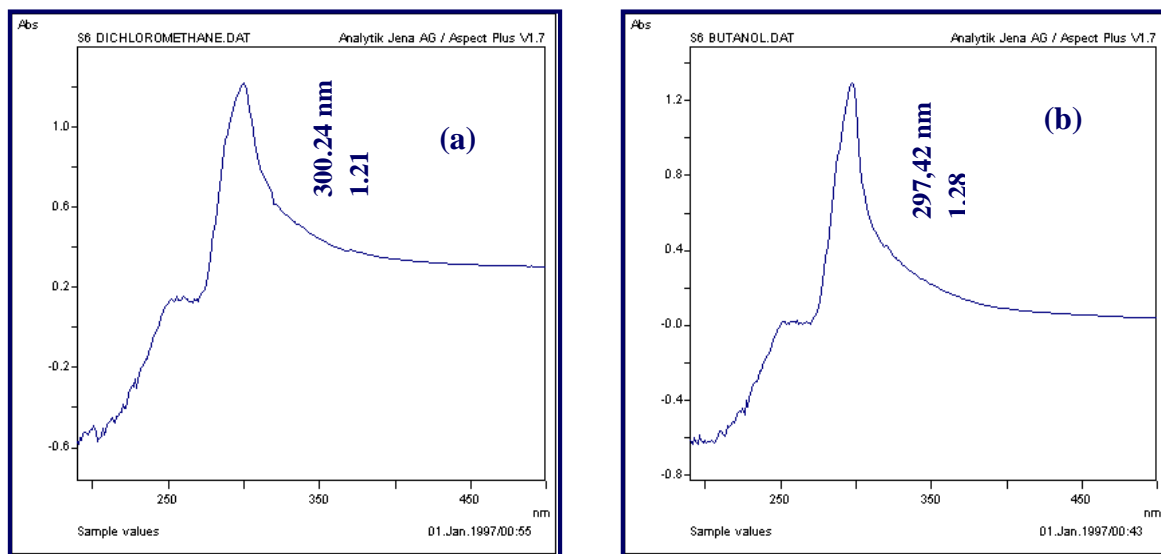


Figure 42: Spectres d'absorption dans l'UV visible des extraits bruts au dichlorométhane (a) et au butanol (b) des surnagants de culture de l'isolat S_6 dissous dans le méthanol.

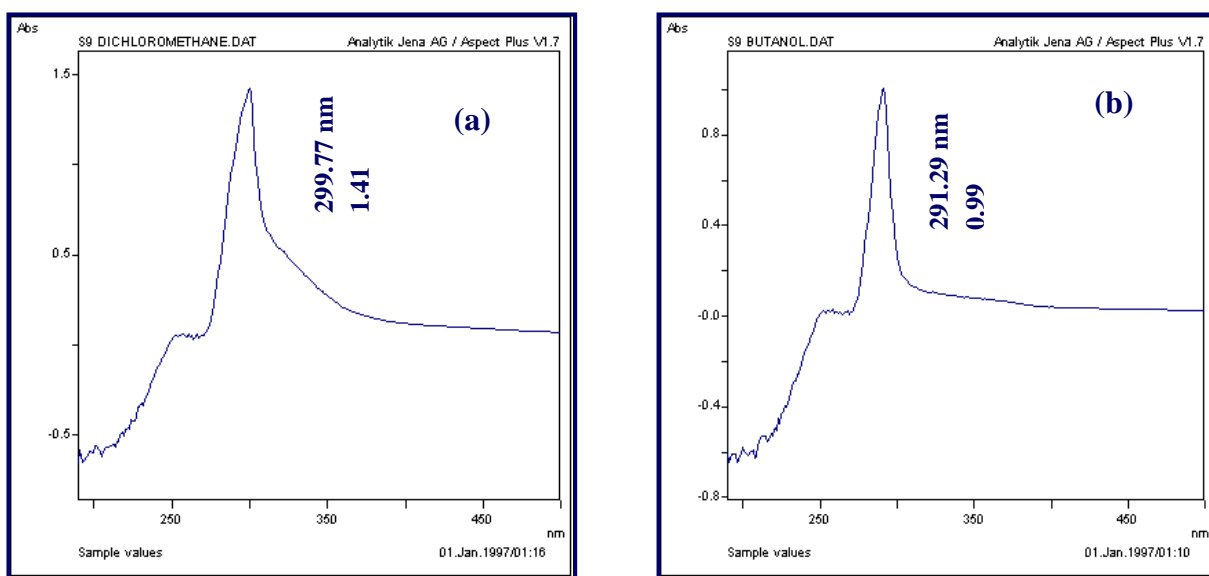


Figure 43 : Spectres d'absorption dans l'UV visible des extraits bruts au dichlorométhane (a) et au butanol (b) des surnagants de culture de l'isolat S_9 dissous dans le méthanol.

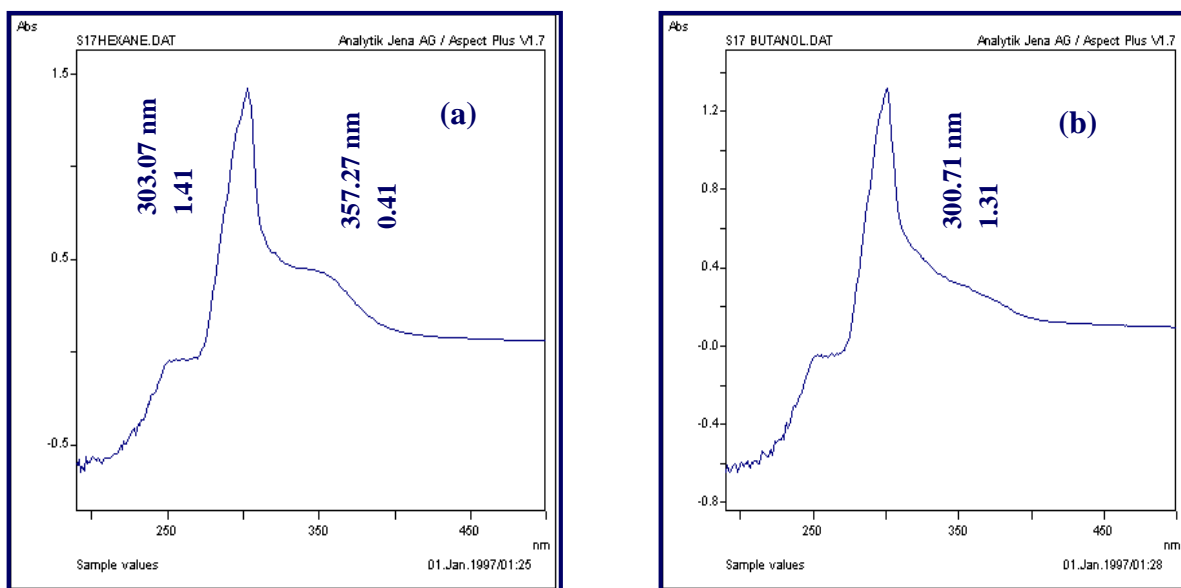


Figure 44 : Spectres d'absorption dans l'UV visible des extraits bruts à l'hexane (a) et au butanol (b) des surnagants de culture de l'isolat S_{17} dissous dans le méthanol.

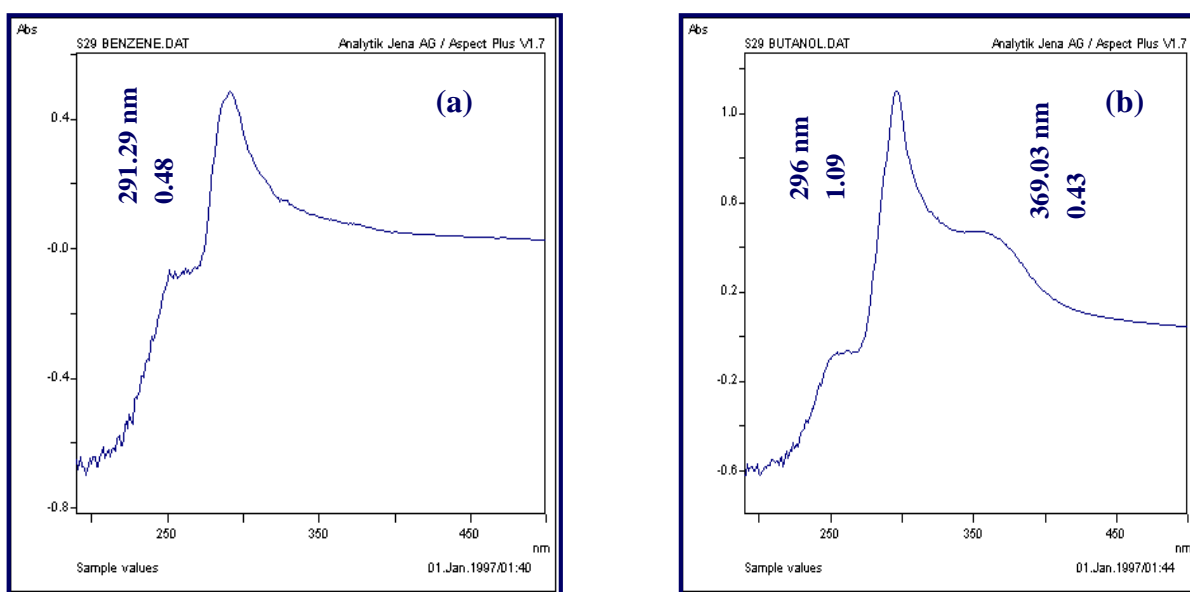


Figure 45 : Spectres d'absorption dans l'UV visible des extraits bruts au benzène (a) et au butanol (b) des surnagants de culture de l'isolat S_{29} dissous dans le méthanol.

Les données relatives aux spectres UV visibles suggèrent que les substances antibiotiques produites par les quatre souches testées n'appartiennent pas à la famille des antifongiques polyéniques lesquels sont caractérisés par la présence de trois maxima très caractéristiques entre 260 et 405 nm (Bastide, 1986).

Le butanol est un solvant qui extrait les polyènes, nous avons réalisé une analyse spectrale afin de savoir si ces composés sont présents dans les phases butanoliques brutes des quatre souches testées. Les spectres (figures 42b, 43b, 44b et 45b) montrent l'absence des pics caractéristiques des composés polyéniques, ce qui exclut donc ce type de molécules.

Comme les phases organiques au dichlorométhane des isolats S_6 et S_9 et les phases organiques à l'hexane et au benzène des isolats S_{17} et S_{29} présentaient de bonnes activités antibactérienne, nous avons donc, à titre de comparaison, effectué une analyse spectrale des extraits.

Les spectres obtenus (figures 42a et 43 a) pour les isolats S_6 et S_9 présentent en général les mêmes allures que les spectres au butanol, les pics obtenus sont (300,24 nm et 299,77 nm) respectivement.

Le spectre UV de l'extrait hexanique de l'isolat S_{17} présente une allure similaire mais avec un pic à (357,27 nm) qui n'est pas observé dans l'extrait au butanol ce qui peut s'expliquer par l'affinité qu'a cette (ces) substance(s) vis-à-vis des ces deux solvants (polarité), elle (s) est (sont) plus soluble (s) dans l'hexane que dans le butanol.

L'isolat S_{29} présente un spectre UV de l'extrait benzenique différent de l'extrait butanolique. En effet, le pic à (369,03 nm) détecté dans l'extrait butanolique n'est plus observé dans ce cas, ce qui suggère une pureté plus importante de la substance dans l'extrait au benzène.

Bien qu'une bonne partie du travail portant sur les conditions de purification n'a pas été affinée, nous avons déterminé les spectres UV des extraits bruts et réalisé quelques révélations chimiques, ce qui nous a permis d'avoir une idée globale sur l'appartenance des substances à des classes d'antibiotiques donnés en les comparant avec d'autres antibiotiques sécrétés par les espèces ou souches appartenant au même genres et cités dans la littérature scientifique.

✚ Substance(s) antibiotique (s) issue(s) des isolats S_6 et S_9

Les données relatives aux révélations chimiques au diphénylamine-aniline, vanilline- H_2SO_4 , ninhydrine et réactif de Dragendorff et aux spectres UV visibles des extraits au dichlorométhane et au butanol (λ max = 300,24 nm et 297,42 nm) pour l'isolat S_6 et (λ max = 299,77 nm et 291,29 nm) pour la souche S_9 , nous permettent d'émettre l'hypothèse suivante :

La /les molécule (s) pourraient être formée (s) de polyéthers (réaction chromogénique intense avec la vanilline- H_2SO_4), et des cycles osidiques (révélés par le diphénylamine- aniline).

✚ Substance(s) antibiotique (s) issue(s) de l'isolat S₁₇

L'ensemble des données préliminaires des révélations chimiques au diphénylamine-aniline, vanilline-H₂SO₄, ninhydrine et réactif de Dragendorff et aux spectres UV visibles des extraits à l'hexane (λ max = 303,07 nm et 357,27 nm) et au butanol (λ max = 300,71 nm) nous permet de penser que la/ les substance (s) active (s) produite (s) par la souche S₁₇ pourraient être formée (s) de cycles osidiques (révélés par le diphénylamine- aniline), de polyéthers (réaction chromogénique avec la vanilline-H₂SO₄) sur lesquels pourrait se fixer des fonctions amines (révélation à la ninhydrine).

✚ Substance(s) antibiotique issue(s) de l'isolat S₂₉

En tenant compte des réactions chromogéniques au diphénylamine-aniline et vanilline-H₂SO₄ et des profils UV des extraits au benzène (λ max = 291,29 nm) et au butanol (λ max = 296 nm et 369,03 nm), nous sommes amenés à émettre l'hypothèse que cette ou (ces) substance(s) serait constituée(s) de cycles osidiques (révélés par le diphénylamine-aniline) et de polyéthers (réaction avec la vanilline-H₂SO₄).

Considérant les caractéristiques microbiologiques et chromogéniques de nos extraits bruts, les antibiotiques connus et répondant à ces descriptions pourraient être des polyéthers pour la souche S₆ et ou des polyéthers glycosylés pour les trois autres isolats S₉, S₁₇, et S₂₉.

4. Discussion

La comparaison des données relatives aux spectres UV ainsi qu'aux réactions chromogéniques des extraits bruts des souches S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉ avec des données bibliographiques, notamment sur les antibiotiques du groupe des polyéthers (réactions positives intenses avec la vanilline-H₂SO₄), menées par plusieurs équipes de recherche durant les années (1970 et 1980), nous laisse supposer la présence de ces composés dans nos extraits bruts.

Selon **Liu et al.** (1978), les antibiotiques polyéthers constituent une large classe d'antibiotiques comportant un grand nombre de composés découverts depuis la mise en évidence de la nigericine en 1951.

D'après **Westley et al.** (1981) et **Bolte et al.** (1982), jusqu'en 1980, une soixantaine de composés appartenant à cette classe d'antibiotique ont été mis en évidence. Tous ces composés diffèrent entre eux par leurs caractéristiques structurales (la présence de groupements carboxyles à une extrémité

de la molécule, la présence d'alcools secondaires ou tertiaires à l'extrémité opposée, présence de cycles éthers et des groupements méthyles). Ces caractéristiques structurales confèrent aux antibiotiques polyéthers la capacité de former des complexes lipidiques solubles avec des cations monovalents tels que (Na^+ , K^+) mais aussi avec des cations divalents tels que (Mg^{2+} et Ca^{2+}) leurs permettant de traverser les membranes lipidiques (**Bolte et al., 1982; Nakayama et al., 1985 & Kart et Bilgili, 2008**).

La fixation et la sélectivité des cations jouent un rôle important dans diverses activités qui leur a valu le nom d'ionophores (**Westley, 1978**)

D'après **Westley, (1978)** la classification de ces molécules antibiotique est basée sur le type de complexation cationique ainsi que leur glycosylation (**Westley et al., 1981**).

Les antibiotiques polyéthers sont des métabolites d'origine microbienne, produits largement par le genre *Streptomyces* mais également par d'autres genres d'actinomycètes tels que : *Streptoverticillium* (**Cassinelli et al., 1967**), *Dactylosporangium*, *Nocardia* et *Actinomadura* (**Nakamura et Isono, 1983**) et sont efficaces contre les coccidies (**Nakayama et al., 1985**) et l'agent causal de la malaria (**Na et al., 2008**).

L'activité antibactérienne des polyéthers est dirigée essentiellement vis-à-vis des bactéries à Gram positif (**Tsuji et al., 1979 ; Watanabe et al., 1981 & Nakayama et al., 1985**).

Ils ne trouvent pas d'applications en thérapie humaine à cause de leur haute toxicité, cependant, ils ont une grande importance économique dans l'industrie de la volaille où ils sont utilisés comme agents anticoccidiens (**Liu et al., 1978**), et comme facteurs de croissance chez les ruminants (**Tsuji et al., 1979 et Nakayama et al., 1985**). **Keller-Juslen et al. (1975)** détectèrent également une activité antivirale dirigée contre le virus de l'Herpes simplex.

Imada et al. (1978) ont mis en évidence une substance antibiotique isolée à partir de l'espèce *Streptomyces hygroscopicus*, nommée **carriomycine**.

- La carriomycine est un antibiotique du groupe des polyéthers, active sur les bactéries à Gram positif, sur les champignons filamenteux, les levures et les mycoplasmes, et non active sur les bactéries à Gram négatif. Elle est également coccidiostatique.
- La carriomycine présente une bonne solubilité dans le méthanol et insoluble dans l'eau, elle donne une couleur violette sur plaque de gel de silice révélée par la vanilline- H_2SO_4 , du bleu indigo est obtenu avec une révélation à l'acide phtalique-aniline, la même couleur a été obtenue en utilisant le diphenylamine –aniline, dans notre cas.

- La structure de la carriomycine a été élucidée entièrement par Otake *et al.* (1977)

L'ionomycine, mise en évidence par Liu *et al.* (1978), est caractérisée par sa forte affinité aux ions calcium, obtenue d'une fermentation de l'espèce *Streptomyces conglobatus*.

- L'ionomycine, comme les autres antibiotiques polyéthers, est soluble dans l'hexane, le benzène..., faiblement soluble dans le méthanol et insoluble dans l'eau.
- Son spectre UV présentait une absorbance maximale à 300 nm (sel de Ca).
- L'ionomycine est fortement active vis-à-vis des bactéries à Gram positif et pas contre les Gram négatifs.

Un nombre important d'antibiotiques polyéthers a été découvert, parmi lesquels nous citons

La **myukamycine sels de sodium**, polyéther glycosylé, produit par l'espèce *Streptomyces hygroscopicus* (fig 46), le **lasalocide**, polyéther carboxylique produit par *S. lasaliensis* (fig 47), la **nigericine**, la **dianemycine**....etc.

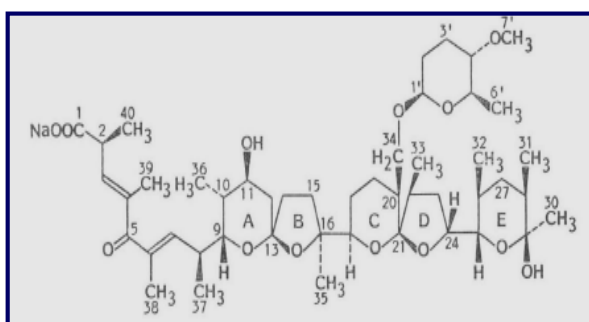


Figure 46 : Structure de la **myukamycine**, sels de sodium (Nakayama *et al.*, 1985)

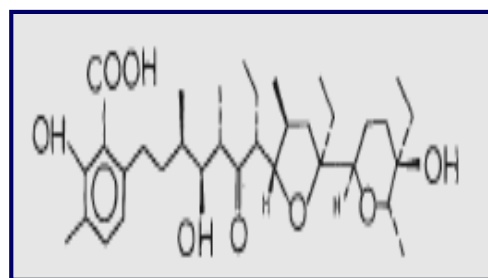


Figure 47 : Structure de l'antibiotique polyéther: **lasalocide** (Bolte *et al.*, 1982).

Ne connaissant pas les caractéristiques physicochimiques de nos extraits bruts (structure chimiques, poids moléculaires ...etc), et tenant compte uniquement des réactions chromogéniques et des caractéristiques biologiques, nous sommes amenés à émettre l'hypothèse que nos substances semblent avoir des propriétés analogues aux molécules de type polyéthers. En effet, les extraits bruts de nos isolats présentaient des activités antimicrobiennes et dirigées essentiellement contre les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *M. luteus* et *B. subtilis*), les champignons filamenteux (tels que *Asp. niger*) et la levure *C. albicans*. Ils n'ont pas d'action vis à vis des bactéries à Gram négatif.

D'après **Callaway et al.** (2003), c'est la propriété lipophile des ionophores, qui exercent leur effets au niveaux des membranes, qui est à l'origine de leurs efficacité vis-à-vis des bactéries à Gram positif et pas des bactéries à Gram négatif. En effet, le peptidoglycane entourant les bactéries à Gram positif est poreux et par conséquent, il permet à des molécules de petites tailles de le traverser pour atteindre la membrane cytoplasmique où l'ionophore, de nature lipophile, se dissous plutôt rapidement. A l'inverse des bactéries à Gram négatif, qui elles, sont séparées du milieu externe et des agents antimicrobiens par une couche lipopolysaccharidique, d'une membrane externe et d'un espace periplasmique.

De plus, nos extraits présentaient des réactions chromogéniques intenses avec la vanilline- H_2SO_4 qui signifie la présence de composés polyéthers et d'alcools supérieurs.

Les isolats S_9 et S_{17} , présentaient également, en comparant les valeurs des R_f , des réactions positives avec le diphénylamine –aniline, ce qui suggère la présence de composés glucidiques en plus des cycles polyéthers.

Comme les isolats testés proviennent d'un sol riche en calcaire et caractérisé par sa salinité importante (d'après l'échelle de Riverside USA), les milieux de production doivent fournir un apport en ions monovalents (Na^+ , K^+) et divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}).

Ces conditions de croissance permettent de penser que ces ions ont de fortes chances de rentrer dans la composition de ce type de composés.

D'après **Gesheva et al.** (2005), la nature et la concentration de certains composés présents dans le milieu de fermentation possèdent un effet marquant sur la production d'antibiotiques et par conséquent, sur la structure chimique de ces substances.

L'étude menée par cette même équipe sur l'influence des sources de carbone sur la production d'antibiotiques par l'espèce *Streptomyces hygroscopicus*, a permis de déterminer que l'utilisation de certains composés carbonés favorisaient plus ou moins la production de certaines substances. En effet, le glucose, le saccharose, le fructose et l'amidon favorisent la production de composés polyéthers, alors que le lactose permet plutôt la biosynthèse d'antibiotiques de la famille des macrolides (**Gesheva et al., 2005**).

Selon **Valan Arasu et al.** (2008) et **Gesheva et al.** (2005), la production d'antibiotiques comme métabolites secondaires est profondément influencée par la nature et la qualité des éléments nutritifs des milieux de culture mais également par des facteurs environnementaux (température, pH...) (**Vilches et al., 1990 ; Bhattacharyya et al., 1998 ; Holmalahti et al., 1998 & Yu et al., 2008**).

Il est évident que les hypothèses avancées sur les éventuelles structures chimiques doivent être confirmées par des tests complémentaires indispensables ; notamment : la purification des substances actives et leur caractérisation par différentes méthodes (bioautographie, HPLC, RMN, IR, spectroscopie de masse...etc).

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antibiotiques. Ceux-ci ont été largement étudiés surtout chez le genre *Streptomyces*, largement dominant dans de nombreux écosystèmes. Cependant, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les recherches ont été orientées vers des genres peu fréquents à rares et provenant d'environnements peu communs voir extrêmes (**Demain et Lancini, 2006**).

Ainsi, la recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinomycètes est crucial pour la découverte de nouvelles espèces et par conséquent la découverte de nouveaux produits naturels bioactifs (**Hozzein et al., 2008**).

Les objectifs visés par ce travail, sont l'isolement et la sélection de souches d'actinomycètes issus d'environnements peu communs, les sols salés. L'étude de leurs activités antibiotiques, l'extraction et la caractérisation partielle des molécules bioactives synthétisées.

Les souches ont été isolées à partir d'échantillons de sol salins prélevés dans la région de Bejaia.

Une analyse physicochimique du sol nous a permis de connaître les caractéristiques et les conditions de croissance des espèces d'actinomycètes dans l'environnement. Ainsi, nous avons pu déterminer que le sol était de texture limono-calcaire, de pH alcalin, pauvre en matière organique, mais également salin. La mesure de la conductivité nous a permis d'affirmer que le sol de cette région est très salin d'après l'échelle de Riverside (USA).

L'utilisation du milieu Williams modifié additionné de 7,5% de NaCl, et de cycloheximide (50 µg/ml) comme milieu d'isolement sélectif, a permis l'obtention de 156 souches présentant une morphologie caractéristique des actinomycètes.

Seules 16 souches ont été retenues sur la base de leurs morphologie caractéristique peu commune mais aussi parce qu'elles présentaient un temps de génération plus court (4 à 5 jours d'incubation), ce qui est un facteur de choix déterminant, pour les tests d'activité. Parmi celles-ci, 8 ont présenté une activité antibactérienne vis-à-vis des 3 bactéries à Gram positif testées (*B. subtilis*, *M. luteus* et *S. aureus*). Considérant les performances des souches étudiées, nous avons opté pour les 4 isolats présélectionnés, provenant de l'isolement effectué en Avril 2007 (purifiées et conservées à 4°C sur milieu Williams modifié à deux concentrations en NaCl à savoir 5% et 7,5%) et dont l'étude a été entamée au laboratoire sous la direction du D^f Kecha.

En recherchant les activités antagonistes sur milieu solide par la méthode des stries croisées et celle des cylindres d'agar vis-à-vis de 6 genres bactériens (3 bactéries à Gram +, 3 bactéries à Gram -), une

levure et 3 genres de moisissures, quatre isolats codés : S₆, S₉, S₁₇ et S₂₉ ont été sélectionnés pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques intéressantes.

La souche codée S₆ présente les caractéristiques spécifiques du genre *Streptoverticillium*, tandis que les trois autres présentaient plutôt une morphologie propre au genre *Streptomyces*.

Chacun des isolats est actif contre au moins un microorganisme cible. Ils présentent tous une activité antibactérienne (contre les bactéries à Gram positif, *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*) et possèdent également, selon les isolats, une activité contre les champignons filamenteux (*Asp. niger*, *Fus polyferatum*) et la levure *Candida albicans* ; et pas contre les bactéries à Gram négatif.

Ces souches ont également fait objet de l'étude de leur antagonisme sur le même milieu liquide où aucune activité n'a été observée. Ceci peut s'expliquer, entre autres, par la faible concentration de l'agent antimicrobien produit. Toutefois, d'autres études ont présentés des résultats comparables. Cette contrainte peut être contournée par l'optimisation des conditions de culture en milieu liquide.

Une étude morphologique (macro et micromorphologie) et une analyse des constituants cellulaires (acide diaminopimélique et sucres) ont permis de rattacher la souche S₆ au genre *Streptoverticillium*, et les trois autres isolats S₉, S₁₇ et S₂₉ au genre *Streptomyces*.

L'étude physiologique effectuée sur les quatre souches, nous a permis de déterminer les différences quant à l'utilisation et la dégradation des composés organiques utilisés, notamment entre les isolats du genre *Streptomyces* S₉, S₁₇ et S₂₉.

Actuellement, la détermination de nouvelles espèces de microorganismes s'effectue non seulement par des méthodes phénotypiques (études morphologique et physiologique) mais aussi par des critères chimiques (chimiotaxonomie) et des critères moléculaires qui s'avèrent être essentiels. Considérant que nos quatre isolats n'ont fait l'objet que d'une étude morphologique, chimique, physiologique limitée mais non moléculaire, il est impossible d'affirmer avec certitude le genre et encore moins l'espèce de chaque isolat.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons effectué la production, l'essai de purification et la caractérisation partielle des principaux antibiotiques sécrétés par chacun des quatre isolats.

La production d'antibiotiques a été réalisée dans le même milieu de culture qui a servi pour l'isolement (Williams modifié). Le milieu Williams modifié est favorable, car ce dernier a été additionné de 1g/l de glucose, cette source de carbone rapidement assimilable est connue comme étant un excellent stimulant de la croissance microbienne (**Hermans *et al.*, 1989**) et sa concentration est déterminante pour la production d'antibiotiques.

Le milieu Williams additionné de 1g/l de glucose a été utilisé comme milieu de production car il a été constaté que l'activité antibiotique après dix jours d'incubation avec la méthode des cylindres d'agar

sur ce même milieu vis-à-vis de divers germes test est très importante donc optimale. Ces résultats confirment ceux de **Sejiny**, (1991) qui a pu déterminer le coefficient de corrélation entre le temps d'incubation et le diamètre des zones d'inhibition. En effet, il a ainsi déduit qu'un temps d'incubation de 10 jours permettait d'avoir des zones d'inhibition importante.

La purification a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM analytique). Les principales molécules bioactives ont été partiellement caractérisées par des méthodes chimiques (révélations chimiques) et spectroscopiques (UV).

Les activités antibactériennes et antifongiques sont extraites avec des solvants différents et cela pour chaque isolat. En effet, les activités antibactériennes des souches S_6 et S_9 ont été récupérées par le dichlorométhane tandis que celle de la souche S_{17} a été obtenue par l'hexane. Les activités antifongiques, quant à elles, ont toutes été retrouvées dans les extraits butanoliques, à part la souche S_{29} , où le benzène a permis la récupération des deux activités.

Le système d'élution choisis est l'Ethanol/ Ammoniaque/ Eau. (60/20/20 v/v/v), ce dernier a permis une bonne séparation des substances antibiotiques présentes dans les différents extraits bruts.

La révélation microbiologique (bioautographie) réalisée n'a donné aucun résultat malgré la bonne migration des substances.

Les révélations chimiques de ces extraits des isolats S_6 , S_9 et S_{17} ont permis de suggérer la présence de composés glucidiques, d'alcaloïdes, d'alcools supérieurs et d'huiles étherées de fonctions amines et de stéroïdes, tandis que la souche S_{29} ne présentait que des composés glucidiques, d'alcaloïdes, d'alcools supérieurs et d'huiles étherées.

L'étude des spectres UV des extraits organiques bruts des quatre isolats suggèrent que les substances antibiotiques produites par les quatre souches testées n'appartiennent pas à la famille des antifongiques polyéniques lesquels sont caractérisés par la présence de trois maxima très caractéristiques entre 260 et 405 nm (**Bastide, 1986**).

Nos extraits présentent des réactions chromogéniques intenses avec la vanilline- H_2SO_4 qui stipule la présence de composés polyéthers et d'alcools supérieurs.

Les isolats S_9 et S_{17} , présentent également, en comparant les valeurs des R_f , des réactions positives avec le diphénylamine –aniline, ce qui suggère la présence de composés glucidiques en plus des cycles polyéthers.

Les antibiotiques polyéthers sont des métabolites d'origine microbienne, produits largement par le genre *Streptomyces* (Nakayama *et al.*, 1985).

En tenant compte uniquement des réactions chromogéniques et des caractéristiques biologiques, nous sommes amenés à émettre l'hypothèse que nos substances semblent avoir des propriétés analogues aux molécules de type polyéthers. En effet, les extraits bruts de nos isolats présentaient des activités antimicrobiennes dirigées essentiellement contre les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *M. luteus* et *B. subtilis*), les champignons filamenteux (tels que *Asp. niger*) et la levure *C. albicans* et n'ont pas d'action vis à vis des bactéries à Gram négatif. De plus, nos extraits présentent des réactions chromogéniques intenses avec la vanilline-H₂SO₄ qui stipule la présence de composés polyéthers et d'alcools supérieurs.

Il est évident que ces hypothèses ne pourraient être confirmées que par des tests complémentaires indispensables, notamment l'obtention de substances purifiées (bioautographie, HPLC) et une caractérisation plus poussée avec des tests tels la RMN, la spectroscopie de masse...etc. L'ensemble des résultats obtenus pour les quatre isolats donne un aperçu général sur le potentiel de ces souches à produire des antibiotiques de différentes familles et avec une variété d'activités biologiques, (antibactériennes, antifongiques et antilevuriennes).

Nos résultats sont encourageants et les perspectives qui en découlent nombreuses. Ils nécessitent la poursuite des études selon trois grandes lignes, l'une relative à l'isolement sélectif des souches des sols salés, la seconde à la détermination des espèces et la taxonomie et la troisième aux antibiotiques produits et ce, par:

- ✚ La considération d'autres échantillons de sol provenant de cette région et l'affinage des méthodes de sélection pour isoler d'autres souches particulières. Les résultats de l'étude physiologique de nos isolats notamment leur aptitude à se développer sur des milieux à forte concentration en NaCl (4M), fournissent des informations sur leurs préférences nutritionnelles et contribuent au développement des milieux d'isolement spécifiques. De plus, la résistance des isolats à certains antibiotiques permet également de choisir ces derniers comme agents sélectifs à incorporer dans le milieu de culture.
- ✚ Le séquençage de l'ADNr 16S des souches nous permettra de savoir si elles présentent une originalité par rapport aux espèces du genre *Streptomyces* mais surtout au genre

Streptoverticillium. En effet, peu d'étude font référence à des espèces halophiles de ce genre. Il serait donc intéressant de pousser l'investigation dans cette direction.

- ✚ L'optimisation de la production des antibiotiques en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources carbonées et azotées, éléments minéraux, aération, pH, etc.).
- ✚ Le développement de méthodes adéquates de purification pour les antibiotiques de la phase aqueuse. Des études sur ces antibiotiques méritent d'être poursuivies.
- ✚ La purification de substances après bioautographies et HPLC et une caractérisation plus poussée avec la RMN, l'IR, la spectroscopie de masse...etc, afin de déterminer éventuellement leurs structures chimiques et leur originalité.
- ✚ La réalisation de tests complémentaires (activités antitumorale, antivirale, inhibition d'enzymes, etc.).
- ✚ Enfin, la réalisation de tests de génotoxicité vis-à-vis des cellules animales, avant de prétendre une application possible de nos antibiotiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abbas. I. H. (2006). - A Biological and Biochemical Studies of Actinomycetes Isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait. **J. Appl. Scien. Resea**, **2** (10), 809-815.
- Abou-Elela. G.M; and Ghanem. N.B. (2005). – Phenotypic characterization and numerical taxonomy of some actinomycetes strains isolated from burullos lake. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, **31** (2), 125-144.
- Alekseyevna Borisova. S. (2004). - Genetic and Biochemical Studies of the Biosynthesis and Attachment of D-Desosamine, the Deoxy Sugar Component of Macrolide Antibiotics Produced by *Streptomyces venezuelae*. **Thèse de Doctorat, University of Texas**.
- Anibou. M; Chait. A; Ziad. A; Taourirt. M; Ouhdouch. Y; and Benherref. A. (2008). - Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. **World. J. Microbiol. Biotechnol**, **24**, 2019–2025.
- Ara. I; and Kudo. T. (2007). - *Krasilnikovia* gen. nov., a new member of the family Micromonosporaceae and description of *Krasilnikovia cinnamonea* sp. nov. **Actinomycetologica**, **21**(1), 1–10.
- Athalye. M; Lacey. J; and Goodfellow. M. (1981). – Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. **J. Appl. Bacter**, **51**, 289-297.
- Athalye. M; Goodfellow. M; Lacey. J; and White. R.P. (1985). - Numerical Classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. **Int. J. Syst. Bacteriol**, **35** (1), 86-98.
- 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.

B

- Badji. B; Riba. A; Mathieu. F; Lebrihi. A; and Sabaou. N. (2005). - Antifungal activity of a Saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. **J. Med. Mycol.**, **15**, 211-219.
- Badji. B ; Zitouni. A; Mathieu. F; Lebrihi. A; and Sabaou. S. (2006). - Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. **Can. J. Microbiol**, **52**, 373–382.
- Badji. B. (2006). - Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. **Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.** 226 p.
- Basilio. A; Gonzalez. I; Vicente. M.F; Gorrochategui. J; Cabello. A; Gonzalez. A; and Genilloud. O. (2003). - Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. **J. Appl. Microbiol**, **95**, 814–823.
- Bastide. A ; de Méo. M ; Andriantsoa. M; Laget. M; and Duménil. G. (1986). - Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. **Mircen. Journal**, **2**, 453-466.
- Becker. B; Lechevalier. M.P; Gordon. R.E; and Lechevalier. H.A. (1964). - Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. **Appl. Microbiol.**, **12**, 421-423.
- 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. **Appl. Environ Microbiol**, **13**(2), 236-243.
- Bentley. S.D; Chater. K.F; Cerdeno-Tarraga. 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; J. Hidalgo; T. Hornsby; S. Howarth; C.-H. Huang; T. Kieser; L. Larke; L. Murphy; Oliver. K; O'Neil. S; Rabbinowitsch. 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.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, Taxonomic outline of the prokaryotes. (2004). Second edition. Garrity. G.M; Bell. J.A; Lilburn. T.G, Springer, New York Berlin Heidelberg.
- Bergey's Manuel. (2007). Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J; and Tindall. B.J. *In*: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Coyright, Michigan State University Board of Trustees.
- Betina. V. (1973). - Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. **J. Chromatogr**, **78**, 41-51.
- Bhattacharyya. B.K; Pal. S.C; Sen. S.K. (1998). - Antibiotic production by *Streptomyces Hygroscopicus* D1.5: Cultural effect. **Rev. Microbiol**, **29** (3).
- Billerbeck. V.G ; Roques. C ; Vanière. P ; and Marquier. P. (2002). - Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle., **Hyg. Rev**, N°3.
- Birbir. M; and Sesal. C. (2003). - Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. **Turk. J. Biol**, **27**, 7-22.
- Bolte. J; Demuynck. C; Jeminet. G; Juillard. J; Tissier. T. (1982). - Etude comparée de trois antibiotiques ionophores: X.537 A (lasalocide), A.23187 (calcimycine) et X.14547 A. Complexation des cations IA et IIA, transport de Ca⁺⁺. **Can. J. Chem**, **60**, 981-989.
- Boudemagh. A; Kitouni. M; Boughachiche. F; Hamdiken. H; Oulmi. L; Reghioua. S; Zerizer. H; Couble. A; Mouniee. D; Boulahrouf. A; Boiron. P. (2005). - Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. **Journal de Mycologie Médicale**, **15**, 39-44.
- Boudjella H. (1994). – Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. **Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. Alger**. 177 p.
- Boudjella. H; Bouti. K; Zitouni. A; Mathieu. F; Lebrihi. A; Sabaou. N. (2006). - Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. **Microbiological Research**, **161**, 288-298.
- Boudjella. H ; Bouti. K ; Zitouni. A ; Mathieu. F ; Lebrihi. A; and Sabaou. N. (2007). - Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. **J. Appl. Microbiol**, **103**, 228-236.
- Boudjella. H. (2007). - Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. **Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach (Alger).pp** 177.
- Boughachiche. F ; Reghioua. S; Oulmi. L ; Zerizer. H ; Kitouni. M. ; Boudemagh. A ; Boulahrouf. A. (2005). - Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes a partir de la sebkha de Ain Mlila. **Sciences & Technologie C**. **23**, 5-10.
- Boullard. B. (1999). – Dictionnaire de Botanique. Ed : ellipses, France. 398 p.
- Bredholt. H; Fjarvik. E; Johnsen. G; and Zotchev. S.B. (2008). -Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. **Mar. Drugs**, **6**(1), 12-24.

C

- Callaway. T.R; Edrington. T.S; Rychlik. J.L; Genovese. K.J; Poole1. T.L; Jung. Y.S; Bischoff. K.M; Anderson. R.C; and Nisbet. D.J. (2003). - Ionophores: Their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Curr. Issues Intest. Microbiol**. **4**, 43-51.
- Canovas.D; Vargas. C; Csonka. L.N; Ventosa. N; and Nieto. J.J. (1998). - Synthesis of Glycine Betaine from Exogenous Choline in the Moderately Halophilic Bacterium *Halomonas elongate*. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**(10), 4095-4097.

- Cassinelli. G ; Grein. A ; Orezzi. P ; Pennella. P ; and Sanfilippo. A. (1967). - New Antibiotics Produced by *Streptovercillium orinoci*, n. sp. **Archiv fiir Mikrobiologie**, **55**, 358-368.
- Cavallo. J.D; Fabre. R; Jehl. F; Rapp. C; Garrabé. E. (2004). - Beta-lactam antibiotics. **EMC-Maladies Infectieuses**, **1**, 129–202.
- Challis. G.L and Hopwood. D.A. (2003). - Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **The National Academy of Sciences of the USA, PNAS**, **100 (2)**, 14555–14561.
- Chater. K.F. (2006). - *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Phil. Trans. R. Soc. B**, **361**, 761–768.
- Choulet. F. (2006). - Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. **Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1**, pp 210
- Coates. A; and Hu. Y. (2007). - Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. **British Journal of Pharmacology**, **152**, 1147–1154.
- Colombié. V. (2005). - Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. **Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse**. pp174.
- Conn. V.M. (2005). - Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. **Thèse de Doctorat. Flinders University**. pp 297.
- Csonka. L.N; and Epstein. W. (1995). – Osmoregulation. In Neidhardt. F.C; Ingral. J.L; Lin. E; Low. K.B; Magsanik. B; Reznitoff. W.S; Kiley. M; Schaechter. M; and Uninberger. H.E. (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*; Cellular and molecular biology, pp 1210- 1223, 2nd edition, American Society of Microbiology, Washington D.C.
- Cui. X.L; Mao. P-H; Zeng. M; Li. W-J; Zhang. L-P; Xu. L-H; and Jiang. C-L. (2001). *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **51**, 357–363.

D

- Dairi. T. (2005). - Studies on Biosynthetic Genes and Enzymes of Isoprenoids Produced by Actinomycetes. **Journal of Antibiotics**, **58 (4)**, 227-243.
- Danilenko. V.N; Mironov. V.A; and Elizarov. S.M. (2005). - Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, **41(4)**, 319–329.
- Das. S; Ward. L.R; and Burke. C. (2008). - Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, **81**, 419–429.
- DasSarma. S; and Arora. P. (2001). – Halophiles in **Encyclopedia of life sciences. London, Nature Publishing Group**, **8**, 458-466.
- DasSarma. S. (2006). - Extreme Halophiles Are Models for Astrobiology. **Microbe**, **1 (3)**.
- Demain. A.L; and Lancini. G. (2006). - Bacterial Pharmaceutical Products in Prokaryotes, **1**, 812–833.
- Deshayes. C ; Falconer. C ; Mazière. N ; Saddler. G ; Sanglier. J.J. et Sire. B. (1989). - Sélection des souches productrices et caractérisation des molécules actives in Larpent. J.P ; Sanglier. J.J, *Biotechnologie des antibiotiques*.
- Dorman. D.E; Hamill. R.L; Occolowitz. J.L; Terui. Y ; Tori. K; Tsuji. N. (1980). - Structure of polyether antibiotic A28695B. **The Journal of Antibiotics**. **33 (2)**, 252-255.
- Duckworth. G.W.D; Jones. B.E; and Van Steenberg. R. (1996). - Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. **FEMS Microbiology Ecology**, **19 (3)**, 181-191.
- Dynia. Z.M; and Sztaricskai. F.J. (1986). - Ultraviolet and light spectrometry. In: A modern analysis of antibiotics. Aszolas. A. Eds, Marcel. Dekker. inc New York, **PP. 19-96**.

E

- Echigo. A; Hino. M; Fukushima. T; Mizuki. T; Kamekura. M; and Usami. R. (2005). - Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). **Saline Systems**, **1**, **8**.
- Elmnasser. N ; Ritz-Bricaud. M ; Guillou. S ; Leroi. F; Orange. N; Bakhrouf. A et Federighi. M. (2006). – Réponse adaptative de *Listeria monocytogenes* au stress osmotique et froid : Implication en sécurité des aliments. **Revue Méd. Vét**, **157** (2), **92-101**.
- El-Nakeeb. M.A ; and Lechevalier. H.A. (1963). - Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. **Appl. Microbiol**, **11** (2), **75-77**.
- El-Shatoury. S; Mitchell. J; Bahgat. M; and Dewedar. A. (2004). - Biodiversity of Actinomycetes in a Constructed Wetland for Industrial Effluent Treatment. **Actinomycetologica**, **18** (1), **1-7**.
- Empadinhas. N; da Costa. M.S. (2006). - Diversity and biosynthesis of compatible solutes in hyper/thermophiles. **International Microbiology**, **9**, **199-206**.

F

- Franco. M.M.C; and Countinho. L.E.L. (1991). - Detection of novel secondary metabolites; **Crit. Rev. Biotechnol**. **11**, **193–276**.

G

- Gesheva. V; Ivanova. V; Gesheva. R. (2005). - Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. **Microbiological Research**, **160**, **243-248**.
- Ghozlan. H; Deif. H; Abu Kandil. R; and Sabry. S (2006). - Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, **52**, **63–72**.
- Ginolhac. A. (2006). - Metagenomique et bioinformatique : Etude des polyketides synthèses bactériennes. **Thèse de doctorat. Université Claude Bernard - Lyon I**. pp **146**.
- Gochnauer. M.B; Leppard. G.G. P; Komararat. M; Novitsky. K. T; and Kuchner. D.J. (1975). - Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*. Gen.et sp. Nov. an extremely halophilic actinomycetes. **Candian J. Microbiol**, **21**, **1500-1511**.
- Goodfellow. M and Williams. S.T. (1983). - Ecology of actinomycetes. **Ann Rev Microbiol**, **37**, **189-216**.
- Grigoriu. D; Delacrétaz. J; Borelli. D ; Lausanne. P. (1986). *Traité de mycologie médicale*. Ed : Doin éditeurs Paris. 482 p.
- Grund. E; and Kroppenstedt. R.M. (1990). – Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardioopsis* Meyer 1976. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **40**, **5-11**.
- Gordon. R.E; Barnett. D.A; Handarhan. J.E; and Hor-Nay-Pang. C. (1974). - *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **24**, **54-63**.
- Guezennec. J. (2004). - Les bacteries des sources hydrothermales profondes à l'origine de nouvelles molécules bioactives ? **Vertigo – la revue en sciences de l'environnement, Ifremer**, **5** (3).
- Gupte. M; Kulkarni. P ; Ganguli. B.N. (2002). - Antifungal antibiotics. **Appl. Microbiol Biotechnol**, **58**, **46–57**.

H

- Hamilton-Miller. J.M. (1973). - Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. **Bacteriol Rev**, **37**(3), **166–196**.
- Harvey. I. (1999). - sélection de tests discriminants pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'alvéolite allergique extrinsèque. **Thèse de Doctorat. Université Laval (Canada)**. pp**127**.
- Hashimoto. Y. (2007). - Development of novel expression systems for actinomycetes. **Actinomycetologica**, **21** (2), **70-75**.

- Hayakawa. H; Yoshida. Y; and Iimura. Y. (2004). - Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. **J. Appl. Microbiol**, **96**, 973–981.
- Hayakawa. M. (2008). - Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. **Actinomycetologica**, **22** (1), 12-19.
- Heinrich. U; Garbe. B; Tronnier. H. (2007). -In vivo Assessment of Ectoin: A Randomized, Vehicle-Controlled Clinical Trial. **Skin Pharmacol Physiol**, **20**, 211–218.
- Hermans. L ; Gossele. F ; et Biot. A. (1989). – Fermentations industrielles. *In: Biotechnologie des antibiotiques.* Larpent. J.P ; et sanglier. J.J. (Eds.). **Masson, Paris, pp. 342-380.**
- Hirsch. C.F; and Christensen. L. (1983). -Novel method for selective isolation of actinomycetes. **Appl. Environ. Microbiol**, **46** (4), 925-929.
- Holmalahiti. J; Raatikainer. O; Wright. A; Laatsch. H; Spohr. A; Lyngberg. OKJ. (1998). - Production of dihydroabikoviromycin by *Streptomyces anualatus*, production parameters and chemical characterization of genotoxicity. **J. Appl. Microbiol**, **85**, 61-8.
- Holt. J.G. (1989).- *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 4, ed. S.T. Williams and M.E. Sharpe, Baltimore, Md: Williams and Williams.
- Horinouchi. S. (2002). - A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *streptomyces griseus*. **Frontiers in Bioscience** **7**, 2045-2057.
- Hozzein. W.N; A. Ali. M.I; Rabie. W. (2008). - A new preferential medium for enumeration and isolation of desert actinomycetes. **World. J. Microbiol. Biotechnol**, **24**, 1547–1552.

I

- Imada. A; Nozaki. Y; Hasegawa. T; Mizuta. E; Igarasi. S; and Yoneda. M. (1978). - Carriomycin, a new polyether antibiotic produced by *streptomyces hygrosopicus*. **The Journal of Antibiotics**, **31** (1), 7-14.
- Imada. C; Koseki. N; Kamata. M; Kobayashi. T; and Hamada-Sato. N. (2007). - Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. **Actinomycetologica**, **21** (1), 27-31.
- Iwai. Y; and Omura. S. (1982). – Culture conditions for screening of new antibiotics. **The Journal of Antibiotics**, **35** (2), 123-141.

J

- Jayasinghe. D.B.A.T. and Parkinson. D. (2008). - Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. **Appl. Soil. Ecol**, **38**, 109 – 118.
- Jensen. P.R; and Fenical. W. (2005). - New Natural-Product Diversity From Marine Actinomycetes *in Drug Discovery and Therapeutic Medicine.*
- Jongrungruangchok. S; Tanasupawat. S; Kitakoop. P; Bavovada. R; Kobayashi. H; and Kudo. T. (2006). - Identification of *Streptomyces* and *Kitasatospora* strains from Thai soils with geldanamycin production strain. **Actinomycetologica**, **20** (1), 10-14.

K

- Kämpfer. P. (2006) - The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. **538–604.** *in Prokaryotes*, V 3, Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Dworkin. M; Falkow. S; Rosenberg. E; Heinz-Schuelfer. K; Stackbrandt. E. ed: Springer New York.
- Kart. A; and Bilgili. A. (2008). – Ionophores antibiotics : Toxicity, mode of action and neurotoxic aspect of carboxylic ionophores. **Journal of Animals and Veterinary Advance**, **7**(6), 748-751.
- Kecha. M. (1996). – Isolement et sélection de deux souches de *Streptomyces* productrices d'aantifongiques non polyéniques. Taxonomie; extraction, purification et caractérisation

- partielle des antibiotiques synthétisés. **Thèse de Magister. Université de Tizi Ouzou. pp 127.**
- Keller-Juslen. C; King. H.D; Kis. Z.L; et Von Wartburg. A. (1975). - Septamycin, a polyether antibiotic taxonomy, fermentation, isolation and characterization. **The journal of antibiotics, 28 (11).**
- Khachatourians. G.G. (1998). - Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **Canadian Medical Association (CMAJ), 159 (9), 1129-1136.**
- Kitouni. M; Boudemagh. A; Oulmi. L; Reghioua. S; Boughachiche. F; Zerizer. H; Hamdiken. H; Couble. A; Mouniee. D; Boulahrouf. A; Boiron. P. (2005). - Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. **Journal de Mycologie. Médicale, 15, 45–51.**
- Kundu. S; Das. S; Mondal. N; Lyla. P.S; and Khan. A. (2008). – Evaluation of halophilic actinomycetes *Actinopolyspora sp* for osmolytes production. **Resea. Jour. Microbiol, 3 (1), 47-50.**
- Kuster. E ; and Williams. S.T. (1964). - Selection of media for isolation of *Streptomyces*. **Nature, 202, 928.**

L

- Lacey. J. (1997). - Actinomycetes in composts. **Ann Agric Environ Med, 4, 113–121.**
- Larpent. J.P; et Sanglier. J.J. (1989). – Biotechnologies des antibiotiques. **Masson. Paris, p. 481.**
- Larpent. J.J. (2000). - Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens, ed : **Tec et Doc, pp 280.**
- Lazzarini. A; Cavaletti. L; Toppo. G; and Marinelli. F. (2000). - Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek, 78, (3-4), 399-405.**
- Le Borgne. S; Paniagua. D; Vazquez-Duhalt. R. (2008). - Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol, 15, 74–92.**
- Lechevalier. M.P ; and Lechevalier. H.A. (1970a). – Composition of whole cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes *in*: The Actinomycetales. Prauser. H; Fisher Verlag. G; Jena, 311-316.
- Lechevalier. M.P; and Lechevalier. H.A. (1970b). - Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **Int. J. Syst. Bacteriol., 20, 435-443.**
- Lechevalier. M.P; De Bievre. C; Lechevalier. H.A. (1977). - Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. **Biochem. Syst. Ecol., 5, 249-260.**
- Lefebvre. O. (2005). - Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins. Thèse de doctorat. **Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. pp 271.**
- Li. W.J; Tang. S.K; Stackebrandt. E; Kroppenstedt. R.K; Schumann. P; Xu. L.H; and Jiang. C.L. (2003). - *Saccharomonospora paurometabolica* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from soil in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1591–1594.**
- Lindenfelser. L.A; Shotwell. O.L; Bachler. M.J; Shannon. G.M; and Pridham. T.G. (1964). – Antibiotics against plant disease. VIII. Screening for non polyenic antifungal antibiotics produced by Streptomyces. **Appl. Microbiol, 12 (6), 508 – 512.**
- Litchfield. C.D; Sikaroodi. M; and Gillevet. P.M. (2006). - Characterization of Natural Communities of Halophilic Microorganisms *in* Methods in Microbiology; **Vol 35: Extremophiles; Elsevier;**
- Liu. W.C; Slusarchyk. D.S; Astle. G; Trejo. W.H; Brown. W.E; and Meyers. E. (1978). - Ionomycin, a new Polyether Antibiotic. **The Journal of Antibiotics, 31 (9), 815-819.**
- Lurie. L.M; Verkhotseva. T.P; and Levitov. M.M. (1975). - penicillin biosynthesis and two phase pattern of *Penicillium chrysogenum* development. **Antibiotiki, 20, 291-295.**

M

- Magarvey. N.A; Keller. T.M; Bernan. V; Dworkin. M; et Sherman. D.H. (2004). - Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. **Appl. Environ. Microbiol**, **70** (12), 7520–7529.
- Mahyudin. N.A. (2008). -Actinomycetes and fungi associated with marine invertebrates: a potential source of bioactive compounds. **Thèse de Doctorat, University of Canterbury (Nouvelle Zélande)**. pp 201.
- Marchal. N; Bourdon; J.L. and Richard. Cl. (1987). - Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. **Doain editor. Paris**, pp. 67-122.
- Maruyama. H.B ; Suhara. Y ; Suzuki-Watanabe, Maeshima. Y; Shimizu. M. (1975). - A new antibiotic, fumaramidmycin I- Production, biological properties and characterization of producer strain. **J. Antibiot**, **28**, 636.
- Matan. N and Matan. N. (2008). - Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). **International Biodeterioration & Biodegradation**, **62**, 75–78.
- Mathieu. C et Pieltain. F. (2003). – Analyses chimiques des sols : Méthodes choisies, ed **Tech et Doc, Lavoisier**, pp 387
- Matsukawa. E; Nakagawa. Y; Iimura. Y; and Hayakawa. M. (2007). - A New Enrichment Method for the Selective Isolation of Streptomycetes from the Root Surfaces of Herbaceous Plants. **Actinomycetologica**, **21** (2), 66-69.
- Matsumoto. A; Takahashi. Y; Iwai. Y; and Ômura. S. (2006). - Isolation of Gram-positive Bacteria with High G+C from Inside Soil Aggregates. **Actinomycetologica**, **20** (2), 30-34.
- McGenity. T.J; Gemmell. R.T; Grant. W.D; and Stan-Lotter. H. (2000). -Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. **Environmental Microbiology**, **2**(3), 243-250.
- McNeil. M.M; and Brown. M. (1994). - The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. **Clin. Microbiol. Rev**, **7** (3), 357-417.
- Mellouli. L; Karray-Rebai. I; Sioud. S; Ben Ameer-Mehdi. R; Naili; Bejar. B.S. (2004). - Efficient Transformation Procedure of a Newly Isolated Streptomyces sp.TN58 Strain Producing Antibacterial Activities. **Current Microbiology**. **49**, 400–406.
- Merck. E. (1975). – Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt. 149 p.
- Mincer. T.J; Jensen. P.R; Kauffman. C.A, and Fenical. W. (2002). - Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, **68** (10), 5005–5011.
- Minnikin. D.E; Patel. P.V; Alshamaony. L; and Goodfellow. M. (1977). - Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **27**, 104-117.
- Mitra. A; Santra.S.C; Mukhejee. J. (2008). - Distribution of actinomycetes, their antagonistic behavior, and the physico chemical characteristics of the world's largest tidal mangrove forest. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, **80**, 685–695.
- Miyadoh S. (1993). – Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach. **Actinomycetologica**, **9**, 100-106.
- 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** (1), 3-14.
- Mordarska. H; Mordarski. M; and Goodfellow M. (1972). – Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, **71**, 77-86.

N

- Na. M; Meujo. D.A.F; Kevin. D; Hamann. M.T; Anderson. M; Hill. R.T. (2008). - A new antimalarial polyether from a marine *Streptomyces* sp. H668. **Tetrahedron Letters**, **49**, 6282–6285.
- Nakamura. G; and Isono. K. (1983). - New species of *Actinomadura* producing a polyether antibiotic, cationomycin. **The journal of antibiotics**, **36** (11).
- Nakayama. H; Seto. H; Otake. N; Yamagishi. M; Kawashima. A; Mizutani. T; and Omura. S. (1985). - Studies on the ionophorous antibiotics xxviii. Moyukamycin, a new glycosylated polyether antibiotic. **The Journal of Antibiotics**, **38** (10), 1433-1436.
- Narayana. K.J.P; Prabhakar. P; Vijayalakshmi. M; Venkateswarlu. Y; and Krishna. P.S.J. (2008). – Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. **Polish Journal of Microbiology**, **57** (1), 35-39.
- Nedal. A. (2007). - Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin. **Thèse de Doctorat**. Norwegian University of Science and Technology , (Norvège). pp 81.
- Nedialkova. D; and Naidenova. M. (2005). - Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. **Journal of Culture Collections**, **4**, 29-35.
- Newman. D.J; Cragg. G.M; and Snader. K.M. (2003). - Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Natural. Product.**, **66**, 1022-1037.
- Nouasri. A. (1996). - Les genres *Microellobosporia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (Actinomycetales) dans les sols sahariens : Taxonomie numérique, production, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. **Thèse de Magister**. pp 130
- Nouredine. L. (2006). - Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. **Thèse de Doctorat**. Université de Tizi Ouzou (Algerie). pp 186.
- Nyyssola. A; and Leisola. M. (2001). - Actinopolyspora halophila has two separate pathways for betaine synthesis. **Arch Microbiol**, **176**, 294–300.

O

- Ochi. K; and Hiranuma. H. (1994). - A Taxonomic Review of the Genera *Kitasatosporia* and *Streptoverticillium* by Analysis of Ribosomal Protein AT-L30. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **44** (2), 285-292.
- Okazaki. T. (2006). - Intrigued by actinomycete diversity. **Actinomycetologica**, **20** (1), 15–22.
- Olano. C; Lombo. F; Mendez. C; and Salas. J.A. (2008). -Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, **10**, 281–292.
- Oren. A. (2002). - Organic compatible solutes. pp 279- 305 in Halophilic Microorganisms and their environments, Cellular origin and life in extreme habitats. V. 5, **Klower Academic Publisher**, pp 595.
- Oren. A. (2006). - Life at High Salt Concentrations 263–282. in Prokaryotes, V 2, ed: 3.A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology and biochemistry. Dworkin. M; Falkow. S; Rosenberg. E; Heinz-Schuelfer. K; Stackbrandt. E. ed: Springer New York.
- Oren. A. (2008). - Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, **4** (2).
- Oskay. M; Tamer. A.U; and Azeri. C. (2004). - Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, **3** (9), 441 – 446.
- Otoguro. M; Hayakawa. M; Yamazaki. T; and Iimura. Y. (2001). - An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineospora* spp. in soil and plant litter. **J. Appl. Microbiology**, **91** (1), 118-130.

Ou. X; Zhang. B; Zhang. L; Dong. K; Liu. C; Zhao. G; and Ding. X. (2008). - SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. **Acta. Biochim. Biophys Sin**, **40** (10), 877-882.

P

Park. J.O; El-Tarabily. K.A; Ghisalberti. E.L; and Sivasithamparam. K. (2002). - Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, **35**, 361–365.

Pataraya. D; Gurielidze. M; Berishvili.T; Cholokava. N; Zaalishvili.G; and Nutsubidze. N. (2008). - Halophylic Actinomycetes from Saline Soils of Eastern Georgia and their Biological Properties.

Pathom-aree. W; Stach. J.E.M; Ward. A.C; Horikoshi. K; Bull. A.T; Goodfellow. M. (2006). - Diversity of actinomycetes isolated from challenger deep sediment (10, 898m) from the Marianne trench. **Extremophiles**, **10**, 181–189.

Pirt. S.J; and Righelato. R.C. (1967). - Effect of Growth Rate on the Synthesis of Penicillin by *Penicillium chrysogenum* in Batch and Chemostat Cultures. **Appl. Environ. Microbiol**, **15** (6), 1284-1290.

Pizzul. L. (2006). - Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. **Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède)**. pp 39 .

R

Rainey. F.A; and Oren. A. (2006). - Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them *in* **Methods in Microbiology**; **Vol 35: Extremophiles**; Elsevier;

Ranalli. G; Grazia. L; and Roggeri. A. (1999). - The influence of hay-packing techniques on the presence of *Saccharopolyspora rectivirgula*. **J. Appl. Microb**, **87**, 359–365.

Rifaat. H.M. (2003). - The biodiversity of *Actinomycetes* in the River Nile exhibiting antifungal activity. **Journal of Mediterranean Ecology**. **4** (4-3), 5-7.

Robert. H; Le Marrec. C; Blanco. C; and Jebbar. M. (2000). - Glycine Betaine, Carnitine, and Choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, **66** (2), 509–517.

Roberts. M. F. (2005). - Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Saline Systems**, **1** (5).

Roberts. M.F. (2006). - Characterization of Organic Compatible Solutes of Halotolerant and Halophilic Microorganisms Communities *in* **Methods in Microbiology**; **Vol 35: Extremophiles**; Elsevier;

Romeo. Y; Bouvier. J; Gutierrez. C. (2001). - La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* (mini-revue). **Lait**, **81**, 49–55.

Rothrock. C; and Gottlieb. D. (1981). - Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. **The Journal of Antibiotics**, **34** (7), 830-835.

Ruan. J.S; Al-Tai. A.M; Zhou. Z.H; Qu. L.H. (1994). - *Actinopolyspora iraqiensis* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil. **Int. J. Syst. Bacteriol**, **44**, 759–763.

S

Saadoun. I; and Gharaibeh. R. (2003). - The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **Journal of Arid Environments**, **53**, 365–371.

Sabaou. N ; Boudjella. H ; Bennadji. A ; Mostefaoui. A ; Zitouni. A ; Lamari. L ; Bennadji. H ; Levevre. G ; et Germain. P. (1998). - Les sols des oasis du Sahara, algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. **Sécheresse**, **9** (2), 147-153.

- Sacramento. D.R ; Coelho. R.R.R ; Wigg. M.D ; de Toledo Luna Linhares. L.F; Gonçalves Matos dos Santos. M; de Azevedo Soares Semêdo. L.T; and Ribeiro da Silva. A.J. (2004). - Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **20**, 225–229.
- Saum. S.H; and Muller. V. (2007). - Salinity-Dependent Switching of Osmolyte Strategies in a Moderately Halophilic Bacterium: Glutamate Induces Proline Biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. **J. Bacteri**, **189** (19), 6968–6975.
- Schrumpf. H. (2006). The Family Streptomycetaceae, Part II: Molecular Biology, 605–622 in : Prokaryotes, V 3, Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Dworkin. M; Falkow. S; Rosenberg. E; Heinz-Schuelfer. K; Stackbrandt. E. ed: Springer New York.
- Schwarz. S ; Kehrenberg. C; Walsh. T.R. (2001). - Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **17**, 431–437.
- Sejny. M.J. (1991). – Growth phases of some antibiotics producing *Streptomyces* and their identification. **J. K. A. U. Sci**, **3**, 21-29.
- Shinji. M. (1993). – Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganism approach. **Actinomycetologica**, **7** (2), 100-106.
- Shirling. E.B; and Gottlieb. D. (1966). - Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **16** (3), 313-340.
- Shomura. T; Yoshida. J; Amano. S; Kojima. M; Inouye. S; and Niida. T. (1979). – Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy, and morphology-productivity relationship of *Streptomyces Halstedii*, strain SF-1993. **The Journal of Antibiotics**, **32** (5), 427-435.
- Sierra. G. (1957). - A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **J. Microbiol. Serol.**, **23**, 15-22.
- Singh. S.L; Baruah. I; and Bora. T.C. (2006). – Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. **Biotechnology**, **5** (2), 217-221.
- Sivakumar. K; Kumar Sahu. M; Thangaradjou. T; and Kannan. L. (2007). - Research on marine actinobacteria in India. **Indian J. Microbiol**, **47**, 186–196.
- Sneath. P.H.A. (1989). – Numerical taxonomy. in : Bergey's Manual of systematic Bacteriology, Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.), Volume 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 2303- 2305.
- Solanki. R; Khanna. M; Lal. L. (2008). - Bioactive compounds from marine actinomycetes. **Indian Jour. Microbiol**, **48**, 410–431.
- Srivibool. R; and Sukchotiratana. M. (2006). - Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. **Songklanakarinn J. Sci. Technol**, **28**(3), 493-499
- Staneck. J.L; and Roberts. G.D. (1974). - Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. **Appl. Environ. Microbiol**, **28** (2), 226-231.
- Stan-Lotter. H; Leuko. S; Legat. A; and Fendrihan. S. (2006). – The Assessment of the Viability of Halophilic Microorganisms in Natural Communities in Methods in Microbiology; Vol 35: **Extremophiles; Elsevier**;
- Strub. C; Brandam. C; Meyer. X and Lebrihi. A. (2008). - Investigations of *Saccharothrix algeriensis* Growth on Synthetic Media. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. **106** (2), 148-153.
- Suzuki. K; Nagai. K; Shimiza. Y; and Suzuki. Y. (1994). - Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. **Actinomycetologica**, **8** (2), 122-127.

Syed. D.G; Tang. S.K; Cai. M; Zhi. X.Y; Agasar. D; Lee. J.C; Kim. C.J; Jiang. C.L; Xu. L.H; and Li. W.J. (2008). - *Saccharomonospora saliphila* sp. nov., a halophilic actinomycete from an Indian soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **58**, 570–573.

T

Takahashi. Y; Matsumoto. A; Seino. A; Iwai. Y; and Omura. S. (1996). – Rares actinomycetes isolated from desert soils. **Actinomycetol**, **10**, 91-97.

Takahashi. Y and Omura. S. (2003). - Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. **J. Gen. Appl. Microbiol**, **49**, 141-154.

Tanaka. Y; and Omura. S. (1990). – Metabolism and products of Actinomycetes- an introduction. **Actinomycetologica**, **4** (1), 13-14.

Tang. S. K; Li. W. J; Dong. W; Zhang. Y. G; Xu. L; and Jiang. C. L. (2003). - Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant Actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. **Actinomycetologica**, **17** (1), 06–10.

Tarkka. M; and Hampp. R. (2008). -Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions *in* Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology, P. Karlovsky (ed.), 14, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Terkina. I.A; Parfenova. V.V; and Ahn. T.S. (2006). - Antagonistic Activity of Actinomycetes of Lake Baikal. **Applied Biochemistry and Microbiology**, **42** (2), 173–176.

Thakur. D; Yadav. A; Gogoi. B.K; Bora.T. C. (2007). - Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **J. Mycolo. Medic**, **17**, 242-249.

Theilleux. J. (1993). - les actinomycètes *in* Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425.

Torsvik. V; and Øvreås. L. (2008). - Microbial Diversity, Life Strategies, and Adaptation to Life in Extreme Soils. **Microbiology of Extreme Soils. Soil Biology**, **13**.

Tsuji. N; Nagashima. K; Terui. Y; and Tori. K. (1979). - Structure of k-41b, a new diglycoside polyether antibiotic. **The Journal of Antibiotics**, **32** (2), 169- 172.

V

Valan Arasu. M; Duraipandiyan. V; Agastian. p; Ignacimuthu. S. (2008). – Antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale**. **18**, 147-153.

Ventosa. A; Nieto. J.J; and Oren. A. (1998). - Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62** (2), 504–544.

Ventosa. A ; Mellado.E ; Sanchez-Porro. C; and Marquez. M.C. (2008). - Halophilic and Halotolerant Micro-Organisms from Soils *in*: **Microbiology of Extreme Soils**. P. Dion and C.S. Nautiyal . (eds.) Soil Biology 13, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Ventura. M; Canchaya. C; Tauch. A; Chandra. G; Fitzgerald. G.F; Chater. K.F; and van Sinderen. D. (2007). - Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, **71** (3), 495–548.

Vijayakumar. R; Muthukumar. C; Thajuddin. N; Panneerselvam. A; and Saravanamuthu. R. (2007). - Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. **Actinomycetologica**, **21** (2), 59-65.

Vilches. C; Mendez. C; Hardission. C; Salas. JA. (1990). - Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. **J. Gen. Microbiol**, **136**, 1447-54.

Von Dohren. H; and Grafe. U. (1997). – General aspect of secondary metabolism *in*: Biotechnology products of secondary metabolism, Rehm. H.J; Reed. J, **Vol 7**, Eds: 2.

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

Waksman. S.A. (1961). – Classification, identification and description of genera and species in the actinomycetes. Vol II. The Williams and Willkins. Co, Baltimore.

Wang. Y; Zhang. Z.S; Ruan. J.S; Wang. Y.M; and Ali. S.M. (1999). - Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 23, 178-187.

Watanabe. K;Watanabe. J; Kuramitsu. S; et Maruyama. H.B. (1981). - Comparison of the activity of ionophores with other antibacterial agents against anaerobes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 19 (4), 519-525.

Watve. M.G; Tickoo. R; Jog M.M; Bhole. B.D. (2001). - How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Arch. Microbiol**, 176, 386–390.

Wellington. E.M; Cresswell. N; Herron. P.R. (1992). - Gene transfer between streptomycetes in soil. **Gene**, 115, 193-198.

Westley. J.W; Evans. R.H Jr; Sello. L.H; Troupe. N; Liu. C; Blount. J.F; Pitcher. R.G; Williams. T.H; and Miller. P.A. (1981). - Isolation and characterization of the first halogen containing polyether antibiotic x-14766a, a product of *Streptomyces malachitofuscus subsp. downeyi*. **The Journal of Antibiotics**, 34 (2), 139-147.

Westley. J.W. (1978). –Polyether antibiotics: versatile carboxylic acid ionophores produced by *Streptomyces*. Hoffman-La roche inc, Nutley, New Jersey. *in: advances in applied microbiology*. Perlman. D.

Whitaker. A. (1992). - Actinomycetes in Submerged Culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 32.

Williams. S.T., Goodfellow. M; and Alderson. G. (1989). – Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*, Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.), Volume 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 2452-2492.

Williams. P.G. (2008). - Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. **Trends in Biotechnology**, 27 (1).

Witt. D; and Stackebrandt. E. (1990). – Unification of the genera Streptoverticillium and Streptomyces, and amendment of Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339 ^{AL}. **Systematic and applied microbiology**, 13 (4), 361

X

Xiang. W; Guo. J; Feng. W; Huang. M; Chen. H; Zhao. J; Zhang. J; Yang. Z; Sun. Q. (2008). - Community of extremely halophilic bacteria in historic Dagong Brine Well in southwestern China. **World J Microbiol Biotechnol**, 24, 2297–2305.

Y

Yala. D; Merad. A.S; Mohamedi. D; Ouarkorich. M.N. (2001). - Classification et mode d'action des antibiotiques. **Médecine du Maghreb**, 91.

Yamaguchi. T. (1965). - Comparison of the Cell-Wall Composition of Morphologically Distinct Actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, 89 (2), 444–453.

Yoshida. M; Matsubara. K; Kudo. T; Horikoshi. K. (1991). - *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 41 (1), 15-20.

You. M.K; and Park.Y.K. (1996). - A new method for the selective isolation of actinomycetes from soil. **Biotechnology Techniques**, 10 (7), 541 - 546.

Yu. J; Liu. Q; Liu. Q; Liu. X; Sun. Q; Yan. J; Qi. X; Fan. S. (2008). - Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. **Bioresource Technology**, **99**, 2087–2091.

Z

Zaitlin. B; and Watson. S.B. (2006). - Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. **40 (9)**, 1741-1753.

Zhang.J.W; Zeng. R.Y. (2007). - Purification and characterization of a cold-adapted α -amylase produced by nocardiosis sp. 7326 isolated from prydz bay, Antarctic. **Marine Biotechnol**, **10**, 75–82.

Zhi. X.Y; Yang. L.L; Wu. J.Y; Tang. S.K; Li. W.J. (2007). - Multiplex specific PCR for identification of the genera *Actinopolyspora* and *Streptomonospora*, two groups of strictly halophilic filamentous actinomycetes. **Extremophiles**, **11**, 543–548.

Zitouni. A. (1995). - Les genres *Nocardiosis* et *Saccharothrix* (Actinomycetales) dans les sols sahariens : Taxonomie numérique ; extraction, purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. **Thèse de Magister, (E.N.S) de Kouba, Alger**, pp 133.

Zitouni. A; Lamari. L; Boudjella. H ; Badji. B ; Sabaou. N; Gaouar. A ; Mathieu. F ; Lebrihi. A; and Labeda. D.P. (2004 a). - *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **54**.

Zitouni. A ; Boudjella. H; mathieu. F; Sabaou. N; and Lebrihi. A. (2004 b). - 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.

Zitouni. A. (2005). - Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiosis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp SA 103. **Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, (Algérie)**. pp 230.

Zitouni. A; Boudjella. H; Lamari. L; Badji. B; Mathieu. F; Lebrihi. A; and Sabaou. N. (2005). - *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Research in Microbiology**, **156**, 984–993.

Zvyagintsev. D.G; Zenova. G.M; Doroshenko. E.A; Gryadunova. A.A; Gracheva. T.A; and Sudnitsyn. I.I. (2007). - Actinomycete Growth in Conditions of Low Moisture. **Biology Bulletin**, Vol. **34 (3)**, 242–247.

Larousse Encyclopédie, (2008) : www.larousse.fr

ANNEXES

ANNEXE 1

ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE DU SOL

I. Analyse granulométrique su sol

***Destruction de la matière organique.**

Peser 10 g de terre séchée à l'air libre et les placer dans un becher de 500ml ; ajouter 50 ml d'eau oxygénée à 20 volumes et commencer l'attaque à froid. Porter sur bain de sable en couvrant le becher avec un verre de montre. Renouveler les additions d'eau oxygénée jusqu'à destruction totale de la matière organique. La réaction est terminée quand toute la mousse a disparu.

***Dispersion.**

Transvaser le contenu du becher dans un flacon d'un litre, ajouter de l'eau distillée sans dépasser le volume de 500 ml et ajouter aussi 25 ml de la solution de pyrophosphate de sodium à 40g/L. Agiter deux heures à l'agitateur rotatif à allure modérée. Amener la suspension à 1 litre avec de l'eau distillée après l'avoir transvaser dans une allonge de sédimentation. Agiter énergiquement cette dernière.

-Détermination des argiles et des limons

Prélever 20 ml à 10 cm de profondeur au bout 4 min 48 sec. A 20°, vider le contenu de la pipette dans une capsule de 50 ml environ. Faire sécher à 105°C.

-Détermination des argiles

Opérer exactement de la même façon après repos de 6 heures à 20°C.

-Détermination des sables

La détermination des sables est réalisée après élimination des argiles et des limons par siphonage. Répéter l'opération plusieurs fois jusqu'à ce que le liquide surmontant les sables soit exempt de limon et d'argile. Récupérer les sables en les faisant passer dans une grande capsule. Porter les sables à l'étuve pour déterminer le poids et les fractions en sables fins et sables grossiers. Fractionner les sables par tamisage (utiliser les tamis de 200 μ m, 50 μ m et 20 μ m).

II. Dosage de la matière organique du sol

***Dosage de la matière organique du sol par la méthode Anne modifiée**

-Peser 1g de terre fine broyée et placer la prise dans un ballon de 250 ml à col rodé muni d'un réfrigérant ascendant.

-Ajouter 10 ml de bichromate de potassium à (8%) et 15 ml d'acide sulfurique concentré.

-Faire bouillir durant 5 min, après condensation de la première goutte.

-Introduire 20 ml de l'échantillon dans un becher de 500 ml, ajouter 150 ml d'eau distillée et une pincée de NaF et 5 à 8 gouttes de diphénylamine.

-Titre à froid le bichromate en excès à l'aide du sel de MOHR (0,2N).

III. Mesure de l'humidité

- Prélever une certaine quantité de terre fraîche (entre 5 et 20g) et la placer dans une boîte en aluminium avec couvercle (préalablement tarée). Peser le tous. C'est le poids humide P_1
- Porter la boîte ouverte et son couvercle à l'étuve à 105°C pendant 24h.
- Retirer la boîte, la fermer et la laisser refroidir dans un dessiccateur. C'est le poids sec P_2
- Le poids de la boîte à tare avec couvercle à vide est P_3 .
- Calculer la différence entre le poids initial et le poids après séchage.

IV. Mesure du pH

- Peser 20 g de terre fine séchée à l'air libre et la placer dans un becher de 100 ml
- Ajouter 50 ml d'eau distillée bouillie et refroidie.
- Agiter énergiquement la suspension pendant quelques minutes à l'aide d'un agitateur en verre ou d'un barreau magnétique.
- Laisser 15 min au repos et agiter de nouveau durant une minute
- Mesurer le pH de la suspension.

V. Détermination de la teneur en carbonate du sol

*Dosage du calcaire total du sol

Le dosage du calcaire total est réalisé par le calcimètre de Bernard.

- Réaliser l'attaque des quantités croissantes de CaCO_3 pur (50 mg ; 100 mg et 200 mg) par 5 ml de HCl dilué au demi et mesurer chaque fois le dégagement du CO_2 .
- Suivant la teneur présumée en carbonate de calcium, passer de 1 à 10 g de terre finement broyée et l'introduire dans l'erlenmeyer.
- Humidifier la terre avec de l'eau distillée et introduire dans l'erlenmeyer le tube à hémolyse contenant l'HCl dilué.

*Dosage du calcaire actif du sol

Extraction

- Dans un flacon de 500 ml, introduire 10 g de sol et 250 ml d'oxalate d'ammonium (0,2N)
- Agiter durant 1 heure à l'agitateur et filtrer sur filtre à plis en rejetant les premiers millilitres du filtrat.

Dosage

- Prélever 10 ml du filtrat et les verser dans un erlenmeyer de 500 ml ;
- Ajouter 5 ml de H_2SO_4 (9N)
- Chauffer vers 60-70°C et titrer par KMnO_4 (0,1N) jusqu'à obtention d'une coloration rose persistante ;
- Titre de la même façon 10 ml de la solution d'oxalate d'ammonium (0,2N)
- Etablir la relation en exprimant la teneur du sol en CaCO_3 en (%), sachant que **1ml de KMnO_4 correspond à 5 mg de CaCO_3 .**

ANNEXE 2

MILIEUX DE CULTURE D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION

I. MILIEU D'ISOLEMENT

1. Milieu WILLIAMS (Williams et Kuster, 1964) (composition du milieu Williams modifié)

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; NaCl : (50/75g); K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g; CaCO₃ : 0,02g; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g; agar : 15g; glucose : 1g ; Eau distillée : 1000 ml. pH 7,2.

II. MILIEUX D'IDENTIFICATION

1. Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

1.1. Milieu ISP1

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

1.2. Milieu ISP2

Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g ; au distillée q.s.p. 1000 ml ; agar: 20 g. pH 7,2.

1.3. Milieu ISP3

Farine d'avoine : 20 g ; solution saline standard : 1 mL ; agar: 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

* Solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0,1 g ; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g ; ZnSO₄, 7H₂O: 0.1 g ; eau distillée q.s.p. 100 ml.

1.4. Milieu ISP4

Amidon: 10 g ; K₂HPO₄: 1 g ; MgSO₄, 7H₂O: 1 g ; NaCl: 1 g ; (NH₄)₂SO₄: 2 g ; CaCO₃: 2 g ; Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

1.5. Milieu Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A) (Athalye et al., 1981)

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

2. Etude physiologique

2.1. Dégradation des glucides et dérivés

-Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH₄)₂SO₄ : 2,64g ; KH₂PO₄ : 2,38g ; K₂HPO₄ : 5,65g; MgSO₄, 7H₂O : 1g; Solution saline* : 1 ml; eau distillée : 1000 ml ; agar : 20g; pH : 6,8-7.

Solution saline: CuSO₄, 5H₂O: 0,64g; FeSO₄, 7H₂O: 0,11 g; MnCl₂, 4H₂O: 0,79 g; ZnSO₄, 7H₂O: 0.15 g; eau distillée : 1000 ml.

2.2. Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80 : 10 ml ; NaNO₃ : 1 g ; extrait de levure : 5 g ; solution saline: 50 ml ; CaCl₂, 2H₂O: 0,1 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml; agar : 18 g. pH 7,2.

* solution saline: K₂HPO₄: 0,25 g ; MgSO₄, 7H₂O: 0,125 g ; NaCl: 0,125 g ; FeSO₄, 7H₂O: 0,00 1 g ; MnSO₄ : 0,00 1 g ; eau distillée q.s.p. 50 ml.

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

2.3. Dégradation de la tyrosine, (Goodfellow, 1971 ; Gordon *et al.*, 1974)

0,4 g de tyrosine est suspendu dans 10 ml d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile pH 7,5 et maintenue en surfusion à 50°C.

La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

2.4. Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1987)

10 g d'amidon dans 100 ml de gélose nutritive.

Une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

2.5. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)

4 g de gélatine dans 100 ml de gélose nutritive.

Le réactif de Frazier permet de mettre en évidence la dégradation de gélatine (auréole claire autour des colonies).

2.6. Dégradation de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974)

10 g de lait en poudre écrémé sont dissous 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 boîtes de Pétri stériles.

L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

2.8. Dégradation des sels de sodium (Gordon *et al.*, 1974)

Sel de sodium (acétate, citrate, oxalate): 2 g, NaCl: 2 g ; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g ; (NH₄)₂HPO₄: 1 g ; KH₂PO₄ : 0,5g ; agar: 15 g ; eau distillée q.s.p. 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.

2.9. Production de pigments mélanoïdes.

Milieu ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glycérol: 15 g ; L-tyrosine: 0,5 g ; L-asparagine: 1 g ; K₂HPO₄: 0,5 g ; MgSO₄,7H₂O: 0,5 g ; NaCl: 0,5 g ; FeSO₄, 7H₂O: 0,01 g ; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL ; agar: 18 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

2.10. Production de nitrate réductase

La recherche de la nitrate réductase est effectuée grâce au réactif de Griess.

2.11. Sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Le milieu Williams liquide pour le tests de sensibilité aux pH 5, 7, 9 et pH 11 et solide pour les tests de sensibilité au phénol, au tellurite de potassium et au chlorure de sodium.

3. Milieu de production d'antibiotiques

Milieu WILLIAMS (Williams et Kuster, 1964)

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO₃ : 2g; NaCl : (50/75g); K₂HPO₄ : 2g; MgSO₄, 7H₂O : 0,05g; CaCO₃ : 0,02g; FeSO₄, 7H₂O : 0,01g; glucose : 1g ; Eau distillée : 1000 ml. pH 7,2.

ANNEXE 3

RÉVÉLATEURS CHIMIQUES UTILISÉS POUR LES ANTIBIOTIQUES (Merck, 1975)

1- Diphénylamine-aniline : révélateur des glucides

* Solution à vaporiser : dissoudre 4 g de diphénylamine, 4 ml d'aniline et 20 ml d'acide phosphorique dans 200 ml d'acétone

* Traitement complémentaire : chauffer pendant 5 min à 100°C. Les taches apparaissent roses, violettes ou bleues.

2- Chlorure de fer ferrique (FeCl₃) : révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.

* Solution de vaporisation : solution de FeCl₃ de 1 à 5% dans HCl 0,5 N.

Les taches correspondant aux phénols sont colorées au bleu vert et celles des acides hydroxamiques, en rouge.

3- Ninhydrine : révélateur des amines, des acides aminés et des oses amines.

* Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'acétone.

* Traitement complémentaire: chauffer à 105 °C jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette, rose).

4- Vanilline-acide sulfurique : révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées.

* Solution de vaporisation : dissoudre 1 g de vanilline dans 1000 ml de H₂SO₄ concentré.

* Traitement complémentaire : chauffer à 120°C pendant 5 à 10 (couleurs violette, rose ou grise).

5- Formaldéhyde-acide sulfurique : révélateur des aromatiques polycycliques.

* Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 ml d'une solution de formaldéhyde (37%) dans 10 ml de H₂SO₄ concentré.

Les taches apparaissent de divers couleurs (brunes, blanches...)

6- Réactif de Dragendorff selon Munier et Macheboeuf : utilisé pour révéler la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléanolamine (PE).

* **Solution a** : dissoudre 0,85 g de nitrate de bismuth basique dans 10 ml d'acide acétique cristallisable et 40 ml d'eau.

* **Solution b** : dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 20 ml d'eau.

* **Solution de réserve** : mélanger a et b (volumes égaux). Cette solution se conserve bien au réfrigérateur (flacon sombre).

* **Solution de vaporisation** : avant emploi, mélanger 1 ml de solution de réserve, 2ml d'acide acétique et 10 ml d'eau.

Les taches de PC et PE apparaissent orange-jaune.

7- Réactif de Tollens, Zaffaroni : révélateur des substances réductrices.

* **Solution a** : solution de nitrate d'argent 0,1 mol/l.

* **Solution b** : ammoniacale 5 mol/l.

* Traitement complémentaire : chauffer pendant 5 à 10 min à 105°C jusqu'à la coloration foncée maximale des tâches.

ANNEXE 4

❖ COURBES D'ÉTALONNAGES

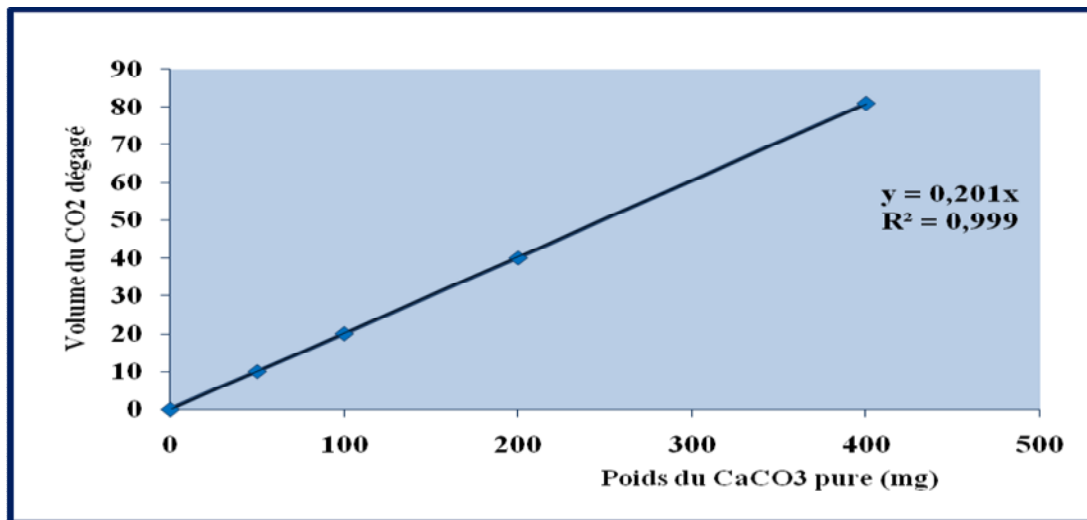


Figure 22 : Courbe d'étalonnage du carbonate total

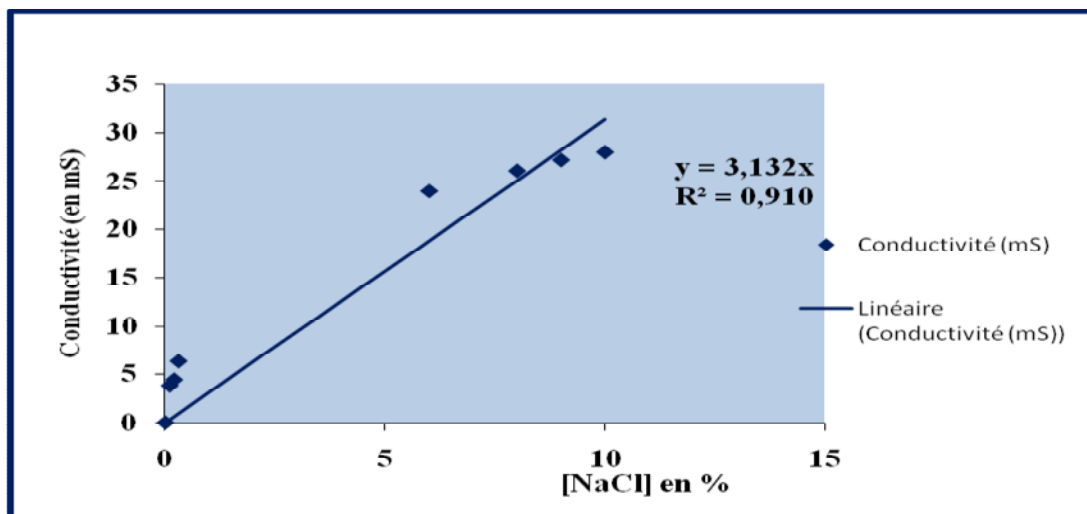


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la conductivité

mmhoS. Cm ⁻¹ dS .m ⁻¹	2		4	6	8	10	12	14	16	18	20
	Riverside USA	Non salé	Légèrement salé	Salé			Très salé				Extrêmement salé

Figure 24 : Classe de salinité en fonction de la conductivité électrique (Riverside USA) (Mathieu et pieltain, 2003)

ANNEXE 5

Tableau XVIII : Résultats des révélations chimiques des extraits au dichlorométhane et au butanol du surnagent de culture de l'isolat S₆.

Isolats S₆			
Révélateur	Couleur des taches et rapport frontal (Rf)		Nature chimique des substances révélées
	Extrait au Dichlorométhane	Extrait au Butanol	
Diphénylamine-aniline	Tache 1 : bleu clair grisonnant Rf₁=0,35 Tache 2 : rose clair Rf₂=0,73	Tache 1 : bleu grisonnant Rf₁=0,35 Tache 2 : gris clair Rf₂=0,41 Tache 3 : rose clair Rf₃=0,73	Substances glucidiques
Vanilline- H₂SO₄	Tache 1 : gris clair Rf₁=0 Tache 2 : violet clair Rf₂=0,52 Tache 3 : bleu nuit Rf₃=0,78	Tache 1 : gris Rf₁=0 Tache 2 : blanc Rf₂=0,72 Tache 3 : bleu nuit violet Rf₃=0,85	Alcaloïdes, alcools supérieurs et huiles étherées
Réactif de Dragendorff	Tache 1 : jaune orangé Rf₁=0,88	Tache 1 : jaune orangé Rf₁=0,88	alcaloïdes et hétérocycles
Ninhydrine	Tache 1 : rose clair Rf₁=0,97	Tache 1 : rose clair Rf₁=0,97	amines, acides aminés et osamines
FeCl₃	Réaction négative	Réaction négative	phénols et acides hydroxamiques
Formaldéhyde H₂SO₄	Réaction négative	Réaction négative	aromatiques polycycliques
Réactif de Tollens	Réaction négative	Réaction négative	substances réductrices

Tableau XIX : Résultats des révélations chimiques des extraits au dichlorométhane et au butanol du surnagent de culture de l'isolat S₉.

Isolats S₉			
Révélateur	Couleur des taches et rapport frontal (Rf)		Nature chimique des substances révélées
	Extrait au Dichlorométhane	Extrait au Butanol	
Diphénylamine-aniline	Tache 1 : gris foncé Rf₁=0,35 Tache 2 : gris clair Rf₂=0,41 Tache 3 : rose clair Rf₃=0,73	Tache 1 : bleu clair Rf₁=0,38 Tache 2 : gris clair Rf₂=0,41	Substances glucidiques
Vanilline- H₂SO₄	Tache 1 : gris clair Rf₁=0,73	Tache 1 : gris foncé Rf₁=0,1 Tache 2 : gris foncé Rf₂=0,2 Tache 3 : gris clair Rf₃=0,3 Tache 4 : blanc Rf₄=0,7 Tache 5 : bleu nuit Rf₅=0,83	Alcaloïdes, alcools supérieurs et huiles étherées
Réactif de Dragendorff	Tache 1 : jaune orangé Rf₁=0 Tache 2 : jaune orangé Rf₂=0,88	Tache 1 : jaune orangé Rf₁=0,88	alcaloïdes et hétérocycles
Ninhydrine	Tache 1 : rose clair Rf₁=1	Tache 1 : rose clair Rf₁=1	amines, acides aminés et osamines
FeCl₃	Réaction négative	Réaction négative	phénols et acides hydroxamiques
Formaldéhyde H₂SO₄	Réaction négative	Réaction négative	aromatiques polycycliques
Réactif de Tollens	Réaction négative	Réaction négative	substances réductrices

Tableau XX : Résultats des révélations chimiques des extraits à l'hexane et au butanol du surnagent de culture de l'isolat S₁₇.

Isolats S₁₇			
Révélateur	Couleur des taches et rapport frontal (Rf)		Nature chimique des substances révélées
	Extrait à l'hexane	Extrait au Butanol	
Diphénylamine-aniline	Tache 1 : bleu clair Rf ₁ =0,32 Tache 2 : gris foncé Rf ₂ =0,39 Tache 3 : gris clair Rf ₃ =0,45	Tache 1 : gris clair Rf ₁ =0,26 Tache 2 : gris foncé Rf ₂ =0,38 Tache 3 : bleu clair Rf ₃ =0,47 Tache 4 : rose violet Rf ₄ = 0,73	Substances glucidiques
Vanilline- H ₂ SO ₄	Tache 1 : gris Rf ₁ =0 Tache 2 : violet foncé Rf ₂ =0,16 Tache 3 : violet clair Rf ₃ =0,25 Tache 4 : violet à bleu grisonnant Rf ₄ =0,41 Tache 5 : violet bleuté Rf ₅ =0,54 Tache 6 : blanc Rf ₆ = 0,67 Tache 7 : gris Rf ₇ =0,74 Tache 8 : violet foncé-prune Rf ₈ =0,81	Tache 1: gris rosé Rf ₁ =0 Tache 2 : violet foncé Rf ₂ =0,51 Tache 3 : blanc Rf ₃ =0,67 Tache 4 : gris Rf ₄ =0,74 Tache 5 : violet foncé-prune Rf ₅ =0,81	Alcaloïdes, alcools supérieurs et huiles étherées
Réactif de Dragendorff	Tache 1 : jaune orangé Rf ₁ =0,88	Tache 1 : jaune orangé Rf ₁ =0,85	alcaloïdes et hétérocycles
Ninhydrine	Tache 1 : rose clair Rf ₁ =0,5	Tache 1 : rose clair Rf ₁ =0,48	amines, acides aminés et osamines
FeCl ₃	Réaction négative	Réaction négative	phénols et acides hydroxamiques
Formaldéhyde H ₂ SO ₄	Réaction négative	Réaction négative	aromatiques polycycliques
Réactif de Tollens	Réaction négative	Réaction négative	substances réductrices

Tableau XXI : Résultats des révélations chimiques des extraits au benzène du surnagent de culture de l'isolat S₂₉.

Isolats S₂₉			
Révélateur	couleur des taches et rapport frontal (Rf)		Nature chimique des substances révélées
	Extrait au Benzène		
Diphénylamine-aniline	Tache 1: gris clair Rf ₃ =0,37		Substances glucidiques
Vanilline- H ₂ SO ₄	Tache 1 : gris très clair Rf ₁ =0 Tache 2 : gris clair Rf ₂ = 0,35 Tache 3 : violet clair à prune Rf ₃ =0,77 Tache 4 : violet prune Rf ₄ =0,83		Alcaloïdes, alcools supérieurs et huiles étherées
Réactif de Dragendorff	Réaction négative		alcaloïdes et hétérocycles
Ninhydrine	Réaction négative		amines, acides aminés et osamines
FeCl ₃	Réaction négative		phénols et acides hydroxamiques
Formaldéhyde H ₂ SO ₄	Réaction négative		aromatiques polycycliques
Réactif de Tollens	Réaction négative		substances réductrices

