



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique

جامعة زيان عاشور - الجلفة

Université Ziane Achour - Djelfa

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie

قسم البيولوجيا

Département de biologie

Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master



FILIERE : BIOLOGIE.

SPECIALITE : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE.

Thème

Recherche bibliographique sur les actinobactéries et leurs substances antimicrobiennes pour faire face au phénomène d'antibiorésistance

Présenté par :

- KHEFEDJ Toufik
- OMRANE Souhila

Soutenue le : 07/10/2021

DEVANT LE JURY :

Président	BOUTAIBA S.	MCA	U-Djelfa
Examinatrice 1	BENMOUAFFEKI F.	MAA	U-Djelfa
Examinatrice 2	CHENOUF N.S.	MAA	U-Djelfa
Encadreur	RACHEDI F.Z.	MAA	U-Djelfa

Année Universitaire 2020/2021

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier «Allah» qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

*Nos tiens à remercier avant tous notre encadreur **Madame Rachedi Fatima Zohra**. Pour leur aide précieuse, pour leur conseil scientifique, Pour son soutien, sa gentillesse, grâce à lui, elle nous a donné un domaine de recherche incroyable et très important dans la biologie.*

*Nos remerciements vont également aux **membres du jury** qui ont accepté de juger ce travail.*

*Nous remercions également **Monsieur TOUMATIA Omrane**. Pour son écoute : votre démarche scientifique nous a permis d'avancer et de mieux comprendre de nombreux phénomènes.*

*Nos remerciements à **Madame CHENNOUF Nadia Safia**. Pour sa gentillesse. Toutes nos reconnaissances et nos gratitude pour l'aider à répondre à toutes les questions en tout temps.*

*Nos remerciements à **Monsieur ADLI Ben Ziane**. Pour son aide, sa gentillesse et son soutien. Et sa belle personnalité et son sourire qui nous ont fait le respecter et l'apprécier.*

*Nos remerciements à **Mlle AL-ZAHRANI Ahud**. Pour son aide, son soutien moral et son énergie positive.*

*Notre sincère reconnaissance à nos enseignants, surtout **M. BOUTAIBA Saad, M. LAHRECH Mokhtar, M. BELAOUNI Hadj Ahmed, M. LAOUN Khalil, Mme. LAHRECH Nour Elhouda, Mme. OUALHA Dalila**. Qui nous ont suivis le long de nos études pour leurs gentillesse, leurs disponibilités d'avoir fourni une aide.*

*Nos remerciements nos amis : **Youcef, Aicha, Salma, Karim, Hamza, Asma et Nadjjet**. Pour toute l'aide qu'ils nous ont apporté durant la période de réalisation de ce travail.*

Dédicace

Je dédie ce travail à:

À mes très chers parents que j'aime plus que tout le monde, pour leurs amours, leurs encouragements incessants et leur soutien aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite.

`` Mohamed et Malika ``

Pour mes cher Frères: `Slami, Nabil et Maamar`

Pour mes chères Sœurs : `Rachida, Khadidja, Hadda et Tourkia`

Et pour meilleurs chère sœur qui ont été à ma côté tout le temps et au meilleur auditeur qui ne se lasse jamais de mon demandes : Nadia

Aux anges de ma famille

Abdelkader, Abdellah, Sabre

Et À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire

À mon inspiration : TF je t'aime et tu seras toujours dans le cœur

À mon binôme et amie Souhila, avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler. Nous avons formé une belle équipe.

À mon ami d'enfance et mon collègue scolaire : Goumiri Youcef

Et tous les employés de laboratoire de l'hôpital d'Ain Oussera surtout :

Ziane, Ahmed Cherif, Mostapha, Kamel, Marouane, Bouzid, Tahar, Ramdane, Mohamed, Abdelhak, Habiba, Djemila, Souad, Warda, Fatima, Ibtisseme, Fatima, Ahlem, Zineb, Amina.

Merci pour les moments heureux que j'ai passés avec vous.

À ma Marraine :

Challal Kahina

Merci pour les conseils et les encouragements

À mes amis : Hamza, Tarek, Youcef, Hocine, Youcef, Nourddine, Okba, Ramdane, Marouane, Abdenour, Oussema, Wafa, Sultana, Nabila

À mes collègues de promotion :

Microbiologie Appliquée 2020/2021

Surtout: Aicha, Karim, Salma, Asma, Nadjet.

À tous les collègues de toute ma vie.

« Aucun de nous en agissant seul ne peut atteindre le succès » {Nelson Mandela}

Merci d'être toujours là pour moi.

Je suis reconnaissant pour tous dans ma vie.

KHEFEDJ Toufik.

Dédicace

Je remercie Dieu pour l'accomplissement de Ses promesses et pour être le Guide de mes pas et mon Appui. Qu'il me soit permis, ici, de remercier tous ceux qui m'ont aidé à réaliser cette recherche.

Je dédie ce travail tout d'abord, A ma source de bonheur et de joie, ceux qui se sont toujours sacrifiés pour me voire réussir mes chères parents :

« BELKHEIR et LAIZA »

Pour leur amour, leur tendresse et leur Présence Dans les moments les plus difficiles. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Merci et que Dieu les protège et les entoure de sa bénédiction et leur procure bonne santé et longue vie.

A ma sœur ELANES et son mari MOUSTAFA et sa petite famille, qui m'ont toujours indiqué la bonne voie et qui ont su m'aider.

A mes chères sœurs AICHA, FATIMA EL ZOHRA et AMINA pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

Je remercie mes sœurs NAKHELA et MESSOUDA pour leur amitié et amour envers moi et pour partager avec moi mes victoires.

Je souhaite personnellement remercier mon binôme TOUFIK et toute la famille KHEFEDJ, avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler, je te remercie donc pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces cinq années partagées.

Sans qui rien n'aurait été pareil.

Cette année fut riche en émotions et je tiens à te remercier pour ton soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous.

Pour finir, je remercie mon amie HALIMA de me motiver lorsque j'en ai besoin.

OMRANE Souhila

Table des matières

Remerciement

Dédicaces

Table des matières

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations.....	I
Listes des figures.....	III
Liste des tableaux	VI
Introduction	01

Chapitre I : Actinobacreries

1. Généralités sur les actinobactéries.....	03
2. Aperçu des caractéristiques génomiques d'Actinobactéries.....	06
3. Critères d'identification.....	07
3.1. Critères morphologiques.....	07
3.1.1. Caractéristiques culturelles ou macromorphologiques.....	07
3.1.2. Caractères micromorphologiques.....	08
3.2. Critères chimiques (chimiotaxonomie).....	10
3.2.1. Constituants pariétaux : isomères de l'acide diaminopimélique et acides aminés.....	11
3.2.2. Composition cellulaire en sucres.....	11
3.2.3. Constituants membranaires et pariétaux (Lipides).....	12
3.2.3.1. Phospholipides.....	12
3.2.3.2. Acides gras.....	12
3.2.3.3. Ménaquinones.....	13
3.2.3.4. Acides mycoliques.....	13
3.3. Critère physiologique et taxonomie numérique.....	13
3.4. Critères moléculaires.....	14
3.4.1. Analyse des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S.....	14
3.4.2 Hybridation ADN-ADN et détermination du pourcentage de guanine-cytosine	15
4. Types des Actinobactéries	16
4.1. Actinobactéries Thermophiles.....	16

..	
4.2. Actinobactéries Acidophiles.....	16
4.3. Actinobactéries Halophiles.....	16
4.4. Actinobactéries Endophytes.....	17
4.5. Actinobactéries Symbiotiques.....	17
4.6. Actinobactéries Endosymbiotiques.....	18
4.7. Actinobactéries Intestinales.....	18
5. Cycle de développement d'actinobactérie.....	19
6. Ecologie des actinobactéries	20
6.1. Aperçu général sur l'écologie des actinobactéries	21
6.2. Répartition des actinobactéries dans le sol	21
7. Importance des Actinobactéries	22
7.1. Importance dans le domaine industriel	22
7.1.1. Production d'antibiotiques	22
7.1.2. Production d'autres substances	23
7.2. Importance dans le domaine agronomique.....	24

Chapitre II : ANTIMICROBIENS

1. ANTIBIOTIQUES	25
1.1. Définition.....	25
1.2. Classification.....	25
1.3. Mode d'action des antibiotiques.....	27
1.4. Résistance bactérienne aux antibiotiques	28
1.5. Type de mécanismes de résistances	30
1.5.1. Inactivation enzymatique de L'antibiotique	31
1.5.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique	31
1.5.3. Pompes à efflux	31
1.5.4. Perméabilité réduite	31
1.5.5. Protection de la cible de l'antibiotique	32
1.5.6. Piégeage de l'antibiotique	32
2. ANTIFONGIQUES	33
2.1. Définition	33
2.2. Classification des agents antifongiques.....	33
2.2.1. Inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol	34
2.2.1.1. Azoles.....	34
2.2.1.2. Allylamines.....	34
2.2.1.3. Morpholines	34
2.2.2. Perturbateurs membranaires fongiques	35
2.2.3. Synthèse de la paroi cellulaire fongique	35
2.2.3.1. Inhibiteurs de la synthèse du β -glucane.....	35
2.2.3.2. Inhibiteurs de synthèse de chitine	36

2.2.4. Inhibiteurs de la biosynthèse des sphingolipides	36
2.2.5. Inhibiteurs de synthèse des acides nucléiques	36
2.2.6. Inhibiteurs de biosynthèse des protéines	37
2.2.7. Inhibiteurs de la biosynthèse des microtubules	37
2.3. Résistances des champignons aux antifongiques	38
3. Biosynthèse des antibiotiques.....	38
4. Facteurs influençant la production d'antibiotiques	38
4.1. Facteurs nutritionnels.....	39
4.2. Facteurs physico-chimiques et environnementaux.....	39

Chapitre III : Isolement, sélection et identification des Actinobactéries

1. Collecte des échantillons	40
1.1. À partir de l'eau	40
1.2. À partir du sol	41
2. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons	43
2.1. Propriété physicochimique de l'eau	43
2.2. Propriétés physico-chimiques du sol.....	43
3. Prétraitement des échantillons	44
3.1. Traitement physique	44
3.2. Traitements chimiques	45
3.3. Traitement physique et chimique	46
4. Isolement des actinobactéries	48
4.1. Préparation des suspensions-dilutions	48
4.1.1. Préparation de suspensions.....	48
4.1.2- Préparation de dilutions.....	48
4.2. Méthodes d'isolement des actinobactéries sur le milieu de culture	49
4.2.1. Choix du milieu de culture par différents habitats et taux d'incubation	50
4.2.2. Méthode d'Enrichissement.....	51
4.2.3. Méthodes de Sélection des actinobactéries	51
4.2.3.1. Antibiotiques sélectifs.....	51
4.2.3.2. Sélection nutritionnelle.....	51
4.2.4. Méthode d'ensemencement	53
4.2.5. Choix des isolats d'actinobactéries	54
4.2.6. Purification et conservation	54
5. Identification morphologique, chimique et physiologique des souches d'actinobactéries isolées	55
5.1. Etude morphologique	55
5.1.1. Macromorphologie	56
5.1.2. Micromorphologie	56
5.2. Etude chimique	58
5.2.1. Obtention de la biomasse mycélienne	58
5.2.2. Analyse des acides aminés pariétaux	59

5.2.3. Analyse des sucres cellulaires	60
5.2.4. Recherche des acides mycoliques pariétaux	61
5.2.5. Analyse des Lipides polaires membranaires	63
5.2.6. Analyse des acides gras cellulaires.....	64
5.3. Etude physiologique et système d'identification numérique.....	66
5.3.1. Etude physiologique	66
5.3.1.1. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des souches	66
5.3.1.2. Effet de la température sur la croissance des souches	66
5.3.1.3. Effet du pH sur la croissance des souches	66
5.3.1.4. Production de pigments mélanoides	67
5.3.1.5. Production de nitrate réductase et de lipase	68
5.3.2. Système d'identification numérique API.....	69
6. Identification moléculaire des souches d'actinobactéries isolées	70
6.1. Extraction et purification de l'ADN génomique	70
6.2. Amplification de la séquence d'ADNr 16S	71
6.3. Electrophorèse sur gel d'agarose	72
6.4. Purification des bandes d'ADN à partir de gel d'agarose	72
6.5. Séquençage ..	73
6.6. Analyse de la séquence d'ADNr 16S et l'arbre phylogénétique	74
Chapitre IV : Études des substances antimicrobiennes	
1. Recherche de l'activité antimicrobienne.....	76
1.1. Choix des microorganismes-cibles	76
1.2. Recherche de l'activité antibactérienne	76
1.1.1. Inocula des bactéries-tests	76
1.3.2. Test d'activité.....	77
1.1.2.1 Test d'activité par technique des cylindres d'Agar	77
1.1.2.2. Test d'activité par la méthode de stries croisées	77
1.3. Recherche de l'activité antifongique	79
1.3.1. Inocula de germes cibles	79
1.3.2. Test d'activité	79
1.3.2.1. Test d'activité par technique des cylindres d'Agar	79
1.3.2.2. Test d'activité par Méthode de stries croisées	80
2. Productions d'antibiotiques	80
2.1. Préparation de l'inoculum	80
2.2. Production d'antibiotique par les techniques de fermentation.....	81
2.2.1. Fermentation solide	81
2.2.2. Fermentation liquide	81
2.3. Cinétiques de production des antibiotiques	84
2.4. Conditions optimales de la fermentation	84
3. Méthodes d'extraction et purification	85
3.1. Extraction des antibiotiques	85

3.1.1. Extraction à partir du filtrat de culture	85
3.1.2. Extraction à partir du mycélium	85
3.2. Anti-biographie	87
3.3. Purification des antibiotiques	87
3.3.1. Purification par chromatographie sur couche mince (CCM)	87
3.3.1.1. Gélose diffusion	88
3.3.1.2. Bioautographie	89
3.3.2. Purification par chromatographie sur colonne	90
3.3.3. Purification par HPLC (High-pressure liquid chromatography)	90
3.3.3.1. Description du système.....	91
4. Identification des antibiotiques par méthodes spectrales	93
4.1. Spectroscopie en UV-visible	93
4.1.1. Principe	93
4.1.2. Application	93
4.2. Spectroscopie dans l'infrarouge (IR)	94
4.2.1. Principe	94
4.2.2. Application	95
4.3. Spectroscopie de masse	95
4.3.1. Principe	95
4.3.2. Application	97
4.4. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	98
4.4.1. Principe	99
4.4.2. Application	101
CONCLUSION	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105
ANNEXES	

ملخص :

تاريخيا ، تلقت الأكتينوبكتيريا الكثير من الاهتمام بسبب قدرتها على إنتاج مختلف المواد من بينها المضادات الحيوية. من ناحية أخرى، فإن وجودهم في كل مكان وخاصة وجودهم في البيئات القاسية قد أعطاهم اهتماما خاصا أمام تصاعد الالتهابات الميكروبية، وسرعة تزايد ظاهرة المقاومة، مما سبب عدم كفاية العلاج أو فشله.

في هذه الدراسة البليوغرافية حول الأكتينوبكتيريا وموادها المضادة للميكروبات، حاولنا إعطاء نظرة عامة على الأكتينوبكتيريا وتصنيفها وطرق تشخيصها (كيميائية، فسيولوجية وجزئية ... الخ.) وأيضا لمعرفة بيئتها وأهميتها في العديد من المجالات ، قدمنا أيضا معلومات عن مضادات الميكروبات وظاهرة المقاومة عند البكتيريا والفطريات، بالإضافة إلى أننا قدمنا نظرة عامة حول طرق إنتاج المضادات الحيوية من طرف الأكتينوبكتيريا ومعرفة العوامل التي تؤثر على إنتاجها.

كما قمنا بإظهار الطرق والتقنيات الرئيسية المستخدمة لعزل وتحديد الأكتينوبكتيريا من أجل ضمان الإنتاج الأمثل للسلاسل المنتجة للجزيات النشطة من خلال دراسة نشاطها. كما تقدم دراستنا لمحة عامة عن جميع التقنيات المستخدمة لإنتاج مضادات الميكروبات عن طريق التخمير السائل أو الصلب والطرق المستخدمة لتحسين إنتاجها ، وتقنيات الاستخراج بواسطة المذيبات العضوية المختلفة ، والتنقية بواسطة التقنيات الكروماتوغرافية (CCM أو HPLC) وتحديد التركيبة الكيميائية للمواد الفعالة بواسطة الدراسات الطيفية (الأشعة تحت الحمراء ، مطيافية الكتلة، الرنين المغناطيسي النووي ^1H و ^{13}C).

الكلمات المفتاحية : الأكتينوبكتيريا، مضادات الميكروبات، المقاومة ، النشاط المضاد للميكروبات، التخمير، الاستخراج، التنقية، التحليل الطيفي.

Résumé :

Historiquement, les actinobactéries ont reçu beaucoup d'attention en raison de leur capacité à produire diverse métabolites comprenant des molécules d'activité antimicrobienne. D'autre part, leur caractère ubiquitaire et surtout leur présence dans des environnements extrêmes leur a donné une attention particulière et devant la recrudescence des infections microbiennes, et le phénomène de la résistance est rapide de plus en plus, ce qui provoque des insuffisances du traitement ou échecs thérapeutiques.

Dans cette étude bibliographique sur les actinobactéries et leurs substances antimicrobiennes. Nous avons essayé de donner un aperçu général sur les actinobactéries, leur classification et leurs caractères (chimiques, physiologiques et moléculaires ...etc.) et aussi connaître l'écologie et l'importance de ces bactéries dans plusieurs domaines, même nous avons donné des informations sur les antimicrobiens et le phénomène de résistance chez les bactéries et les champignons, en plus nous avons donné une vue générale sur la biosynthèse et les facteurs influençant la production d'antibiotiques. Nous avons porté les principales méthodes et techniques utilisés pour l'isolement et l'identification des actinobactéries afin d'assurer un isolement sélectif à des souches productrices des molécules actives par l'étude d'activité.

Notre étude donne aussi une vue sur l'ensemble des techniques utilisés pour réaliser une production des antimicrobiens par une fermentation liquide ou solide et même les méthodes utilisées pour améliorer leurs production, les techniques d'extraction par différents solvants organiques, purification par des techniques chromatographiques (CCM ou HPLC) et caractérisation des substances actives par des études spectroscopiques (infra-rouge, spectre de masse, RMN ^1H et du ^{13}C) pour déterminer leurs structures chimiques.

Mots clés : Actinobactérie, Antimicrobiennes, Résistance, Activité antimicrobienne, Fermentation, Extraction, Purification, Spectroscopie.

Abstract :

Historically, actinobacteria have received a lot of attention due to their ability to produce various metabolites comprising molecules of antimicrobial activity. On the other hand, their ubiquitousness and especially their presence in extreme environments has given them special attention and in the face of the resurgence of microbial infections, and the phenomenon of resistance is growing rapidly, causing treatment inadequacies or therapeutic failures.

In this bibliographic study on actinobacteria and their antimicrobial substances. We have tried to give a general overview on actinobacteria, their classification and their characteristics (chemical, physiological and molecular ... etc.) and also to know the ecology and the importance of these bacteria in several areas, even we have given information on antimicrobials and the phenomenon of resistance in bacteria and fungi, in addition we have given a general view on the biosynthesis and the factors influencing the production of antibiotics. We have carried out the main methods and techniques used for the isolation and identification of actinobacteria in order to ensure selective isolation to strains producing active molecules by activity study.

Our study also gives an overview of all the techniques used to produce antimicrobials by liquid or solid fermentation and even the methods used to improve their production, extraction techniques by different organic solvents, purification by chromatographic techniques (CCM or HPLC) and characterization of active substances by spectroscopic studies (infrared, mass spectrum, ^1H and ^{13}C NMR) to determine their chemical structures.

Key words: Actinobacteria, Antimicrobials, Resistance, Antimicrobial Activity, Fermentation, Extraction, Purification, Spectroscopy.

[LISTE DES ABREVIATIONS]

- ADN:** Acide désoxyribonucléique.
- ARN:** Acide ribonucléique.
- ARNr 16S:** Acide ribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S.
- ATBs :** Antibiotiques.
- ATCC :** American Type Culture Collection.
- ATFs :** Antifongiques.
- ATMs :** Antimicrobiennes.
- BLAST:** The Basic Local Alignment Search Tool.
- CA :** Chitin agar.
- CCM:** Chromatographie sur couche mince
- CE :** Conductivité Electrique.
- Ch-V:** Milieu chitine-vitamines agar.
- Cm :** Centimètre.
- CM :** Complexe Medium.
- CMA:** Complex medium agar
- CMI:** Concentrations minimales inhibitrices.
- DAP:** Acide diaminopimelique.
- DDH :** DNA-DNA Hybridation (Hybridation ADN-ADN)
- EMA :** Agence européenne des médicaments
- FDA:** Food and Drug Administration.
- g :** Gramme.
- G+C:** Guanine et Cytosine.
- GN :** Gélose nutritive.
- HPLC:** Chromatographie liquide à haute performance.
- HV :** Humic acid Vitamine agar.
- HV :** Vitamine et acide humique.
- ICSB :** Comité international de bactériologie systématique
- INPV :** Institut Nationale de Protection des Végétaux
- IR:** Infrarouge.
- ISP:** International *Streptomyces* project.
- KDa :** Kilo Dalton.
- LPS:** Lipopolysaccharide.
- m/z:** Rapport masse sur charge.

[LISTE DES ABBREVIATIONS]

- m:** Mètre.
- M:** Molaire.
- MA:** Mycélium aérien.
- Mb:** Mega base.
- MEB :** Microscope électronique à balayage
- MEGA:** Molecular evolutionary genetics analysis.
- min :** Minute
- ml :** Millilitre
- mm:** Millimètre
- MRSA :** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.
- MS:** Mycélium du substrat.
- NCBI:** National Center for Biotechnology Information.
- NRRL:** Northern Regional Research Center.
- PCR:** Polymerase chain reaction.
- PDA:** Potato dextrose agar.
- q.s.p:** Quantité suffisante pour.
- rf:** Rapport frontal.
- RF:** Rectiflexible.
- RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire.
- Rpm:** Rotation par minute.
- SCA:** Starch Casein Agar.
- SCE :** Source de carbone et d'énergie.
- SDS:** Sodium dodecyl sulfate.
- SEM:** Scanning electron microscopy.
- Smf :** Fermentation submergée.
- SMF :** Submerged fermentation.
- SSC :** Sodium saline citraté.
- SSF :** Fermentation de substrats solides.
- SSF :** Solide state fermentation.
- TEM :** Microscope électronique à transmission.
- UFC:** Unité formant colonie.
- UV :** Ultra-Violet.
- w/v :** weight / volume.
- µg /ml :** Microgramme/ millilitre.

Figure 1 : Dendrogramme montrant les relations phylogéniques entre les différentes familles de la classe des actinobactéries, établi sur la base de l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S.....	4
Figure 2 : Aperçu taxonomique actuel pour le phylum des Actinobactéries.....	6
Figure 3: Croissance d'un isolat d'actinobactérie sur milieu agar de caséine et amidon.....	8
Figure 4 : Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries.....	9
Figure 5 : Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de <i>Streptomyces</i>	10
Figure 6: Mycélium du substrat avec des chaînes de spores de <i>Streptomyces</i> sur le milieu Amidon-Caséine incubée à 32°C /7 jours.....	10
Figure 7 : Chimio-types rencontrés chez les actinobactéries.....	11
Figure 8: Structure générale des ménaquinones.	13
Figure 9 : Organisation du gène codant pour l'ARNr 16S.....	15
Figure 10: Schéma du cycle de vie de <i>Streptomyces</i> dans les conditions naturelles.....	19
Figure 11 : Applications importantes des actinobactéries.....	22
Figure 12 : Antibiotiques des Actinobactéries.....	23
Figure 13 : Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques.....	28
Figure 14: Les types de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	29
Figure 15 : Mécanismes de résistance au sein des bactéries Gram négatives.....	30
Figure 16 : Sites d'action des différentes classes d'antifongiques.....	33
Figure 17 : Échantillonnage d'un cours d'eau à gué.....	40
Figure 18 : Échantillonnage d'un cours d'eau à partir d'un pont (A) et échantillonneur utilisé (B).....	41
Figure 19 : Différents techniques d'échantillonnage des sols	42
Figure 20 : Influence du traitement par ondes ultrasonores à l'UFC entre les actinobactéries et d'autres bactéries.....	47
Figure 21 : Principe de la technique suspension-dilution.....	49
Figure 22 : Instruments utilisés pour la technique des stries.....	53
Figure 23 : Technique de plaque à tartiner avec plateau tournant et épandeur de verre.....	54
Figure 24 : Colonie d'actinobactéries poussant sur gélose.....	56
Figure 25 : Observation morphologique.....	57
Figure 26 : Observation des actinobactéries avec méthode d'incorporation de transplantation.....	58
Figure 27 : La fragmentation du mycélium du substrat et la véritable ramification.....	59

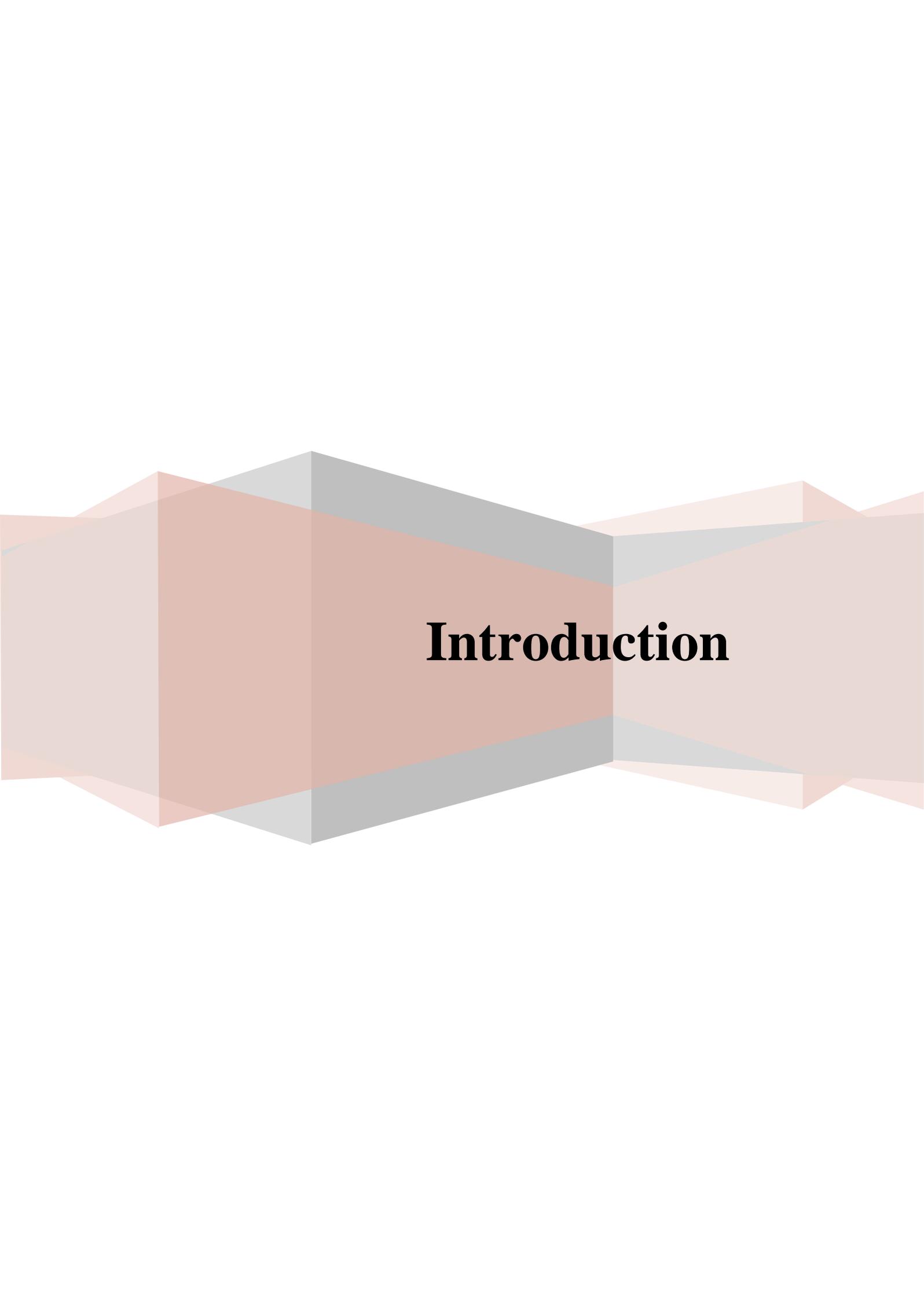
Figure 28 : L'étape de l'analyse des acides aminés par méthode de Becker.....	60
Figure 29 : Séparation des sucres cellulaires entiers de l'hydrolysat cellulaire entier par chromatographie sur couche mince.....	61
Figure 30 : Cinq étapes impliquées dans l'extraction des acides gras.....	65
Figure 31 : Pigments du potentiel d'actinobactéries.....	68
Figure 32 : Organigramme opérationnel API 20NE.....	69
Figure 33 : Organigrammes pour les principales étapes de l'extraction et de la purification de l'ADN.....	70
Figure 34 : Le principe de l'amplification de l'ADN.....	71
Figure 35 : Image d'une électrophorèse post-gel.....	72
Figure 36 : Comparaison de la récupération de l'ADN à partir du gel entre différentes méthodes	73
Figure 37 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger.....	74
Figure 38 . Activité antibactérienne des cylindres d'actinobactéries vis-à-vis de <i>S. aureus</i> ATCC25923	77
Figure 39 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide par la méthode des stries croisées	78
Figure 40 : Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode de stries croisées d'actinobactéries isolé vis-à-vis des bactéries Gram (+) et Gram (-).....	78
Figure 41 : Activité antifongique des cylindres d'actinobactéries vis-à-vis de <i>A. carbonarius</i> A731C et <i>A. niger</i> 2CA936	79
Figure 42 : Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode de stries croisées d'actinobactéries isolés vis-à-vis des champignons phytopathogènes.....	80
Figure 43 : Techniques utilisées pour les fermentations liquides et solides (fermentation SSF et SMF).	83
Figure 44 : Protocole d'extraction d'antibiotique.....	86
Figure 45 : Test d'activité par technique d'anti-biographie.....	87
Figure 46 : Illustration du fonctionnement d'une CCM.....	88
Figure 47 : Localisation des activités par bioautographie des extraits organiques des cellules et du filtrat de culture et du mycélium d'actinobactéries.....	89
Figure 48 : Chromatographie sur colonne.....	90
Figure 49 : Schéma d'une chaîne HPLC.....	91

[LISTE DES FIGURES]

Figure 50 : résultats des composants purifiés sous forme chromatogramme.....	92
Figure 51 : Principe de la spectrophotométrie UV.....	93
Figure 52 : Potentiel anharmonique et niveaux d'énergie.....	94
Figure 53 : Spectre d'infrarouge (IR).....	95
Figure 54 : Etapes de la spectrométrie de masse.....	96
Figure 55 : Etapes de la spectrométrie de masse en tandem.....	96
Figure 56 : Principe des techniques utilisées.....	97
Figure 57 : Résultats des spectres d'antibiotique par technique de spectrométries de mass.....	98
Figure 58 : Spectre RMN 1H montrant les principaux métabolites.....	100
Figure 59 : Composants d'un équipement de RMN.....	101
Figure 60 : Résultats des spectres d'antibiotique par technique de spectrométries de mass par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	102

[LISTE DES TABLEAUX]

Tableau 1 : Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries.....	5
Tableau 2 : Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les actinobactéries....	12
Tableau 3 : Distribution des actinobactéries dans la nature.....	21
Tableau 4 : Classifications d'antibiotique selon la structure chimique.....	26
Tableau 5 : Prétraitements thermiques sélectifs pour l'isolement des actinobactéries.....	45
Tableau 6: Prétraitement chimique pour l'isolement des actinobactéries.....	46
Tableau 7 : Milieu d'isolement des actinobactéries et incubation selon l'habitat.....	50
Tableau 8 : Antibiotiques sélectifs utilisés dans la sélection des actinobactéries.....	52
Tableau 9 : Les agents cryoprotecteur pour conservation des actinobactéries.....	55
Tableau 10 : L'extraction et l'analyse des acides mycoliques à partir de cellules entières...	62
Tableau 11 : Types de phospholipides.....	63
Tableau 12 : Tampons biologiques communs, leurs plages de pH effectives et leurs valeurs de pKa à 25°C.....	67
Tableau 13 : Spécificité de séquence des amorces PCR utilisées pour amplification.....	71
Tableau 14: Quelques germes cibles pour la recherche d'activité antimicrobienne.....	76
Tableau 15 : Comparaison entre la fermentation solide et liquide.....	82
Tableau 16 : Les conditions pour l'extraction à partir du filtre de culture.....	85



Introduction

Depuis l'introduction de la pénicilline au cours des années quarante du siècle passé, un grand nombre d'agents antibactériens ont été développés et commercialisés à des fins thérapeutiques, réduisant ainsi la morbidité et la mortalité humaine importantes associées aux infections (**Boerlin et White, 2006**). L'incidence accrue des maladies fongiques au cours des dernières décennies est principalement due à l'émergence et à la transmission de la résistance aux antifongiques par des agents pathogènes fongiques et bactériennes (**Saha et al., 2012**). Pourtant, l'optimisme initial, fut rapidement renversé quand les premiers rapports d'émergence de phénomène résistances virent le jour peu après leur introduction (**Harbottle et al., 2006**). En réalité, ce phénomène était tout à fait prévisible, et en 1945, Alexander Fleming, lors de la conférence qu'il donna au cours de la cérémonie de remise du Prix Nobel, mettait déjà en garde la communauté scientifique du danger encouru lors d'un usage inapproprié, tel qu'un sous-dosage, des pénicillines et des conséquences d'un tel acte *in vitro* et *in vivo* (**Fleming, 1945**). Malgré les progrès des interventions préventives, diagnostiques et thérapeutiques, les infections microbiennes provoquent une mortalité. Cela est dû au développement d'une résistance à presque toutes les classes de médicaments disponibles sur le marché (**Souagui, 2015**).

Depuis des milliers d'années, les êtres humains utilisent des microorganismes (bactéries, levures et moisissures) pour fabriquer des nombreux produits. Ces microorganismes omniprésents dans notre environnement d'occuper une place importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie. Parmi les microorganismes présentant un intérêt biotechnologique, les actinomycètes (était l'ancienne appellation de ce groupe bactérien) ou bien les actinobactéries (**Smaoui, 2010**).

Ces actinobactéries sont des microorganismes procaryotes ayant un pourcentage de guanine-cytosine élevé (supérieur à 55%) qui les différencie des autres bactéries. En outre, elles forment phylogénétiquement une branche à part et sont caractérisées par une très grande diversité morphologique, pouvant aller de la forme cocci à la forme mycélienne parfaite (**Goodfellow, 2012**). Il existe une diversité physiologique importante au sein de cette communauté microbienne puisque l'on retrouve également des thermophiles, des psychrophiles, des alcalophiles, des acidophiles, des halophiles et des fixateurs d'azote (**Goodfellow et al., 2012**). Cette grande diversité métabolique fait que les actinobactéries soient retrouvées dans divers environnement y compris les plus extrêmes (**Tiwari et Gupta, 2013**). Jusqu'à la fin des années 1940, les actinobactéries étaient considérées comme des organismes particuliers de peu d'importance pratique. Cependant, après la découverte de la streptomycine par Schatz et Waksman en 1943, il y

a une explosion d'intérêt pour ces organismes et leur importance pharmaceutique, médicale, vétérinaire, agricole et écologique est devenue appréciée (**Logan, 1994**). Environ 6000 antibiotiques d'origine microbienne ont été caractérisés, et environ 60% d'entre eux sont produits par des actinobactéries. Ces antimicrobiennes ont eu une grande influence sur les soins de santé humaine et animale, l'industrie de la fermentation et les sciences naturelles (**Gunasalus, 1986**).

Antimicrobien on le définit comme une substance chimique produite par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voir même de détruire d'autres microorganismes (**Muylaert et Mainil, 2012**). L'origine des molécules antimicrobiennes peut être naturelle, semisynthétique ou synthétique. Ainsi, depuis le début des années quatre-vingt-dix, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de découvrir de nouveaux antibiotiques, aussi bien pour la médecine humaine et vétérinaire que pour l'agriculture (**Gupte et al., 2002**).

Actuellement la production de nouvelles molécules « bioactives » sur les souches pathogènes et résistantes aux antibiotiques disponibles fait l'objet de plus en plus de projets de recherche interdisciplinaires. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, par une recherche bibliographique approfondie sur les actinobactéries de point de vue taxonomique (savoir les techniques d'isolement et d'identification des nouveaux genres et des nouvelles espèces ou souches), connaître les différentes méthodes de production, d'amélioration de production, d'extraction, de la purification et de l'identification des substances actives produites par les actinobactéries. Dans l'espoir de bien comprendre les techniques et les recherches qui ont été faites pour pouvoir l'exploiter dans le but d'augmenter la probabilité de découvrir des nouvelles molécules bioactives produites par des actinobactéries pour faire face à l'émergence du phénomène de la résistance.

Chapitre I :

Actinobactéries

1. Généralités sur les actinobactéries :

Les actinobactéries ont été souvent considérés comme des microorganismes intermédiaires entre les champignons et les bactéries en raison de leur structure mycélienne (**Waksman, 1950**). Les actinobactéries sont des bactéries généralement saprophytes, hétérotrophes, aérobies et mésophiles (ou parfois thermophiles). Ils sont rencontrés sur une grande variété de substrats naturels: sols, air, fumier, composts, débris végétaux, pollen, sédiments marins, lacs, rivières, mers et océans, etc. (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Dans l'édition du Bergey de 2012, la classe des Actinobactéries est définie comme regroupant des bactéries à un taux élevé en guanine-cytosine (supérieur à 55%) et qui forme un groupe homogène sur la base des données moléculaires. Ainsi, cette classe est passé d'un seul Ordre (Actinomycetales), d'une seule Famille (*Actinomycetaceae*) et de 7 Genres décrits au début du siècle dernier (**Buchanan, 1916**), à 15 Ordres, 43 Familles et 203 Genres en 2012 (**Goodfellow et al., 2016**).

Les actinobactéries sont classées dans le Domaine des Bacteria, le Phylum des Actinobacteria, la Classe des Actinobacteria et la Sous-Classe des Actinobacteridae. Le phylum des Actinobacteria contient 6 classes, 21 ordres, 53 familles et 221 genres (Tableau 1) (**Manuel de Bergey, 2012**), alors qu'il contenait en 2004 une seule classe (Actinobacteria) et un seul ordre (Actinomycetales). Les genres sont caractérisés par une diversité morphologique importante, allant du simple cocci (ex.: *Micrococcus*) à des formes mycéliennes qui peuvent être fragmentées (ex.: *Nocardia*) ou non (ex.: *Streptomyces*). Les genres d'actinobactéries les plus courants sont *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* (**El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006**).

Les actinobactéries sont encore appelées actinomycètes. Elles étaient auparavant considérées comme étant des bactéries à Gram positif capables de former des spores asexuées (conidiospores ou sporangiospores) et des hyphes ramifiés non fragmentés ou fragmentés. Leur développement donnait lieu à des colonies circulaires constituées de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973; Lechevalier, 1981**). Ceci explique leur dénomination «actinomycètes» du Grec « aktino, mycetes » ou « champignons à rayons » ou encore « champignons rayonnants » (**Gottlieb, 1973**). La taxonomie phylogénétique des Actinobactéries basée sur le séquençage de l'ARN 16S est montrée dans la Figure 1.

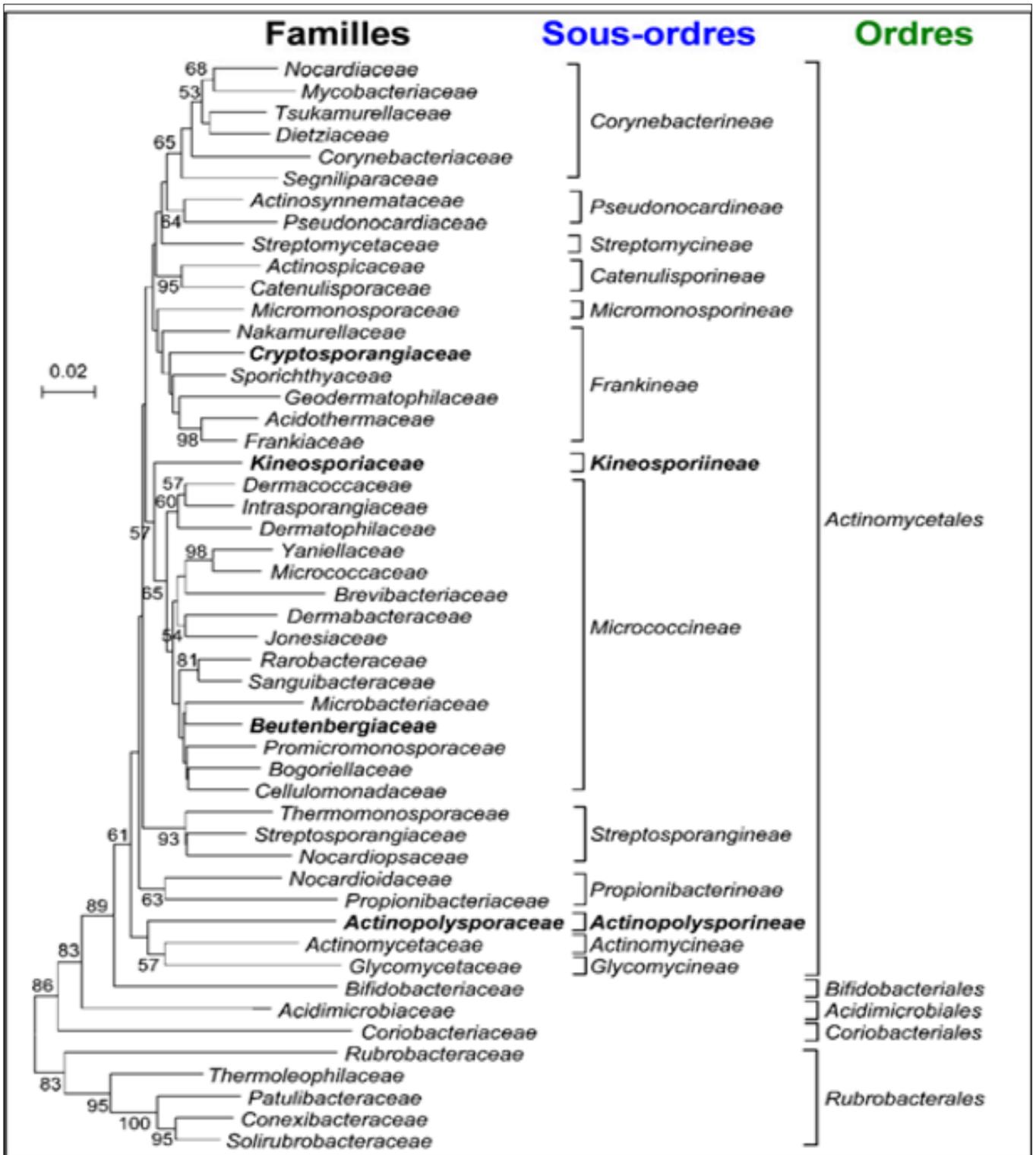


Figure 1 : Dendrogramme montrant les relations phylogéniques entre les différentes familles de la classe des actinobactéries, établi sur la base de l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S (Kämpfer, 2010).

Note : La barre indique 0,02 substitution par position de nucléotide.

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

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

2. Aperçu des caractéristiques génomiques d’Actinobactéries :

Les caractéristiques génomiques d'un nombre limité d'Actinobactéries ont été décrites par divers auteurs (**Bentley *et al.*, 2004**). Dans la dernière revue complète sur ce sujet par Ventura *et al.* Les caractéristiques de 20 génomes actinobactériens disponibles en 2007 ont été résumées. Cependant, le nombre de génomes actinobactériens séquencés a été multiplié par plus de 8 (157 complets et 474 en cours), fournissant une source abondante pour de telles études. L'énorme diversité phénotypique des Actinobactéries se reflète bien dans leurs génotypes. Ces sous-classes sont en outre subdivisées en un certain nombre d'ordres et de sous-ordres différents (Figure 2A) et les rangs taxonomiques des sous-classes et des sous-ordres sont éliminés, et ils sont maintenant élevés aux rangs des classes et des ordres, respectivement (Figure 2B) (**Gao et Gupta, 2012**).

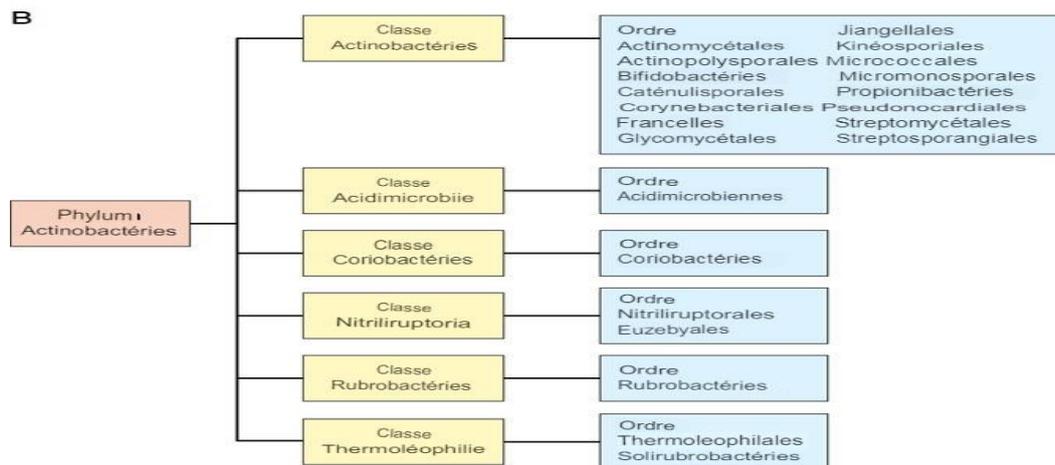
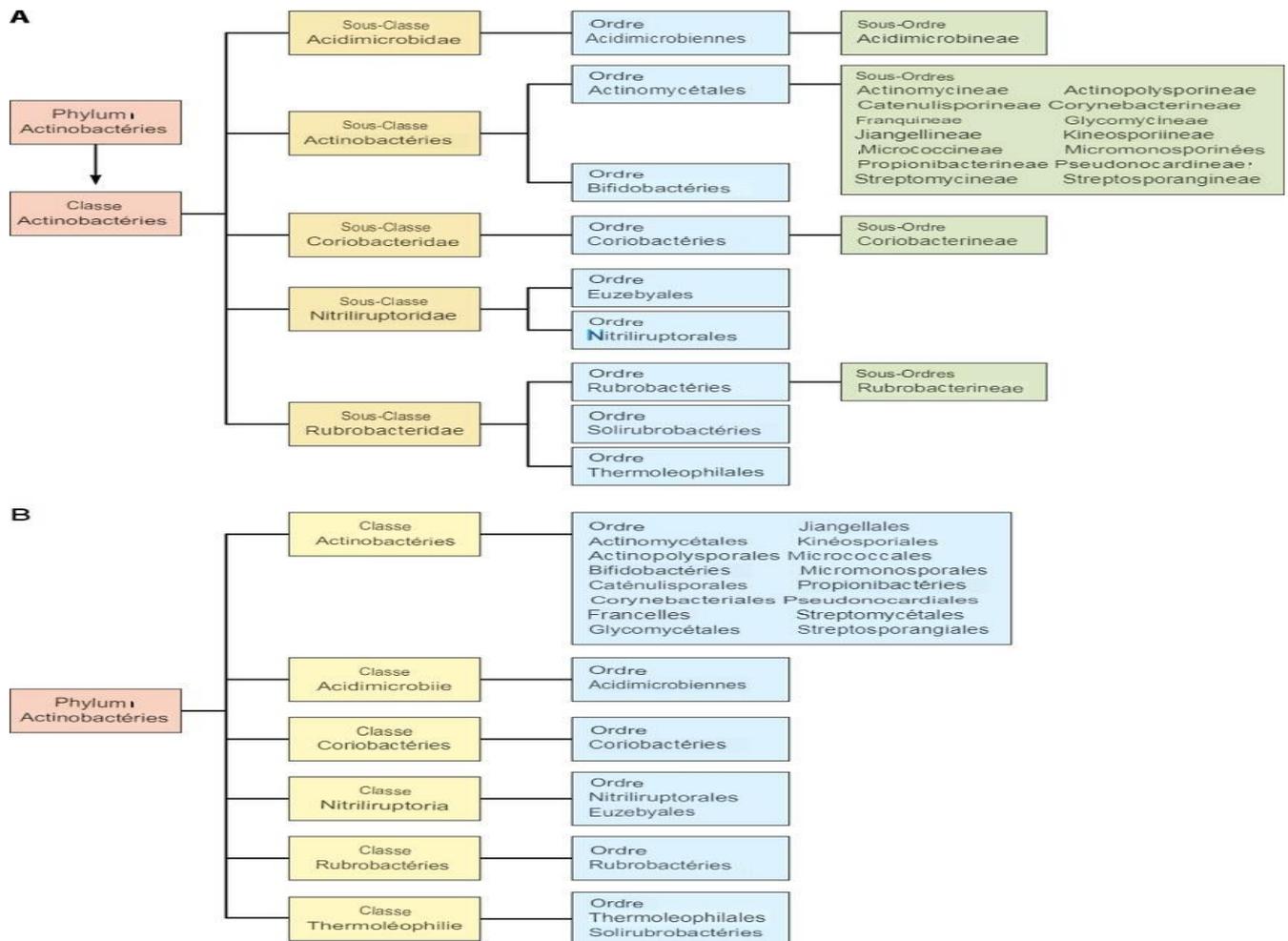


Figure 2 : Aperçu taxonomique actuel pour le phylum des actinobactéries (**Gao et Gupta, 2012**).
Note : (A) : le phylum des actinobactéries basé sur la Liste des Noms Procaryotes avec Position dans la Nomenclature. (B) : taxonomie proposée pour les Actinobactéries dans le Manuel de bactériologie systématique de Bergey à paraître

3. Critères d'identification :

À l'origine, les approches classiques pour l'identification des actinobactéries étaient basées sur des observations morphologiques, une chimiotaxonomie et des critères physiologiques et moléculaires. Des observations morphologiques ont été effectuées pour identifier une souche inconnue au niveau du genre, y compris l'identification de la présence de mycélium aérien et du mycélium du substrat. Critères chimiotaxonomiques tels que la détection des isomères de l'acide diaminopimélique (DAP). La détermination de la forme LL (Levo) des isomères DAP ou du méso est généralement suffisante pour la caractérisation des groupes Actinobactéries. Un large éventail de caractéristiques physiologiques a été évalué, y compris le profil d'utilisation des glucides, d'azote, la dégradation ou l'hydrolyse de nombreux substrats (**Barka et al., 2016; Amin et al., 2017**)

L'identification des actinobactéries par des méthodes traditionnelles telles que les caractéristiques phénotypiques n'est pas aussi précise que les méthodes génotypiques (Critères moléculaire) a été reconnue comme un outil puissant pour l'identification des actinobactéries (**Heuer et al., 1997; Busti et al., 2006**).

3.1. Critères morphologiques :

Les caractères morphologiques importants permettant de différencier les genres d'actinobactéries entre eux, sont les suivants :

3.1.1. Caractéristiques culturelles ou macromorphologiques:

Les caractéristiques culturelles des actinobactéries sont déterminées sur différents milieux de culture. Il s'agit de noter la production ou non de mycélium aérien (MA) et la présence ou non de mycélium du substrat (MS). Les couleurs du MA, du MS et de celle des pigments diffusibles, en cas de production, sont déterminées à l'aide d'une charte de couleurs. (**Shirling et gottlieb, 1966 ; Bouras et al., 2008**).

➤ Mycélium aérien :

Le mycélium aérien est l'hyphe que le mycélium du substrat développe jusqu'à un certain stade et se développe dans l'air. Parfois, les hyphes aériens et le mycélium du substrat sont difficiles à distinguer. Ceci est facile à distinguer par une préparation d'empreinte sur une lame de couverture, vue dans un système sec avec un microscope optique (**Warwick et al., 1994**). La formation de toutes sortes d'hyphes aériens d'actinobactéries dépend des caractéristiques de l'espèce, des conditions nutritionnelles ou du facteur environnemental. Le mycélium aérien de certains genres se développe à un certain stade dans la chaîne de spores de forme supérieure, qui est un hyphe reproducteur produisant des spores (**Li et al., 2016b**) (**Figure 3A**).

➤ **Mycélium de Substrat:**

Appelé mycélium végétatif ou mycélium primaire, le mycélium du substrat se développe dans le milieu ou à la surface du milieu de culture. La fonction principale du mycélium du substrat est l'absorption des nutriments pour la croissance des actinobactéries. Les actinosynnèmes sont différenciés en mycéliums de substrat avec des hyphes à longues ramifications qui pénètrent dans la gélose et se développent et forment des synnèmes. Les mycéliums du substrat sont des couleurs blanches, jaunes, oranges, rouges, vertes et autres (Li *et al.*, 2016b) (Figure 3B).

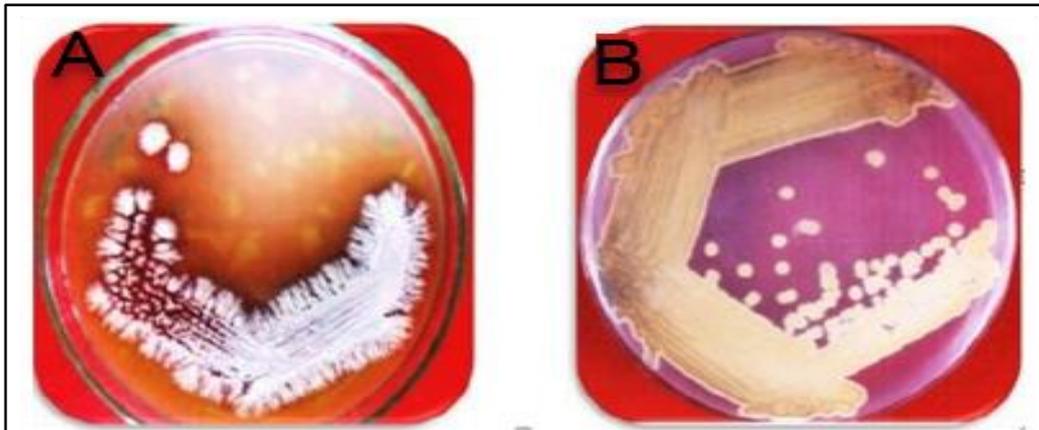


Figure 3 : Croissance d'un isolat d'actinobactérie sur milieu agar de caséine et amidon (Ranjani *et al.*, 2016).

Note: A. mycélium aérien. B. mycélium de substrat.

3.1.2. Caractères micromorphologiques :

Les caractères micromorphologiques sont déterminés par l'observation directe au microscope optique (et parfois électronique) des cultures poussant sur les milieux gélosés (Tresner *et al.*, 1961; Holt *et al.*, 1994). Les observations portent sur les mycélia aérien et du substrat. Le MA peut être stérile, fragmenté ou sporulant. Les spores sont généralement non mobiles ou parfois mobiles, isolées ou regroupées par deux, par quatre ou en chaînes plus ou moins longues. Les spores peuvent être sessiles ou portées par des sporophores courts ou longs ou encore formées anarchiquement sur le MA. Quelques genres d'actinobactéries possèdent des structures particulières, comme les sporanges, les sclérotés ou les synnemata (Figure 4). Le MS peut être stérile ou non, fragmenté ou persistant. Il peut produire ou non des spores (mobiles ou non) ou des sporanges (Toumatia, 2015) (Figure 5 et 6).

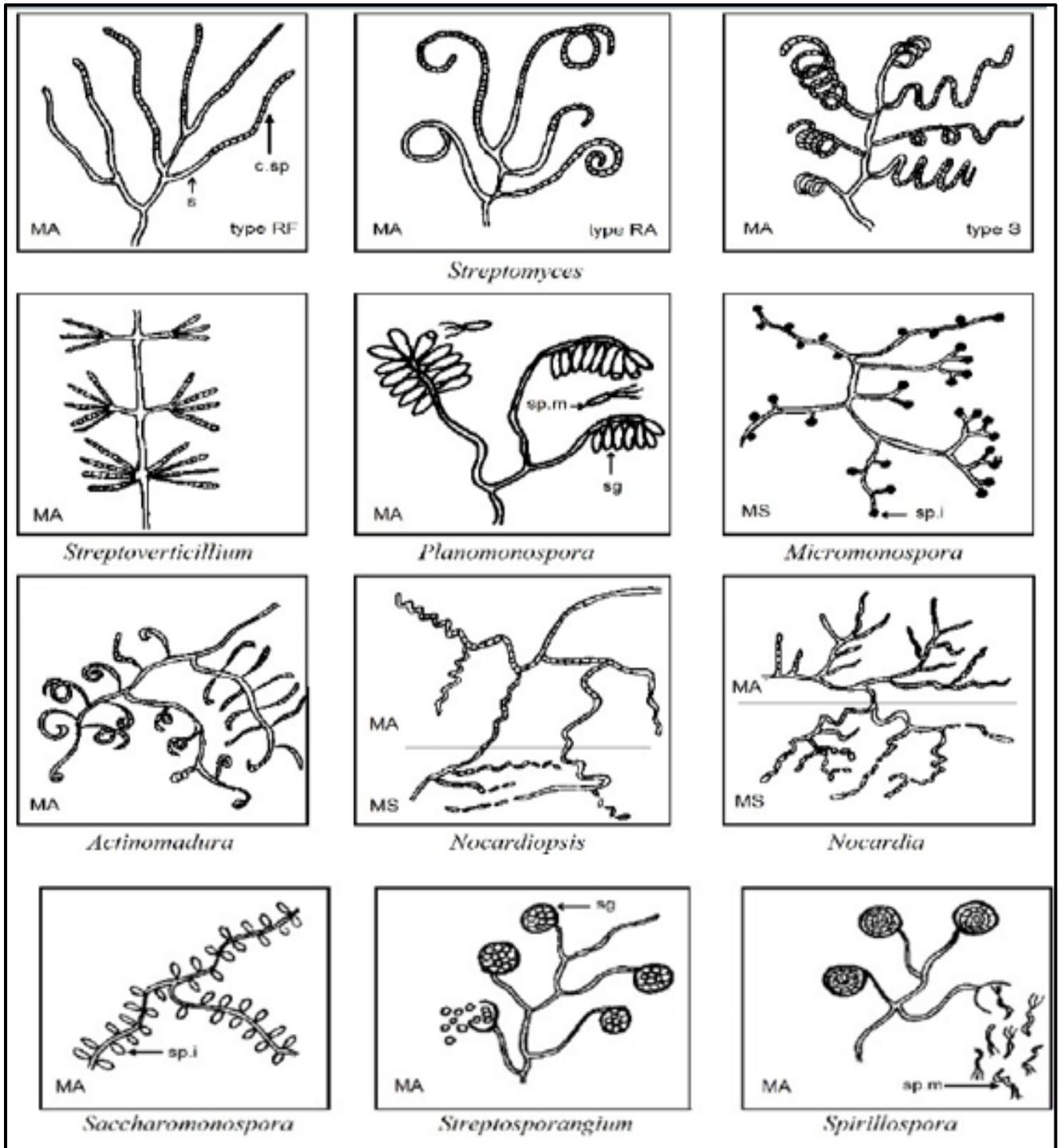


Figure 4 : Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (Sabaou, 1988).

Note : MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaines de spores droites à flexueuses) RA, *Retinaculum Apertum* (chaîne en crochets ou en boucles) S, *Spira* (chaines spiralées) S; sporiphore ; c.sp., chaines de spores; sp.i., spores isolées; sp.m., spore mobiles; sg, sporanges.

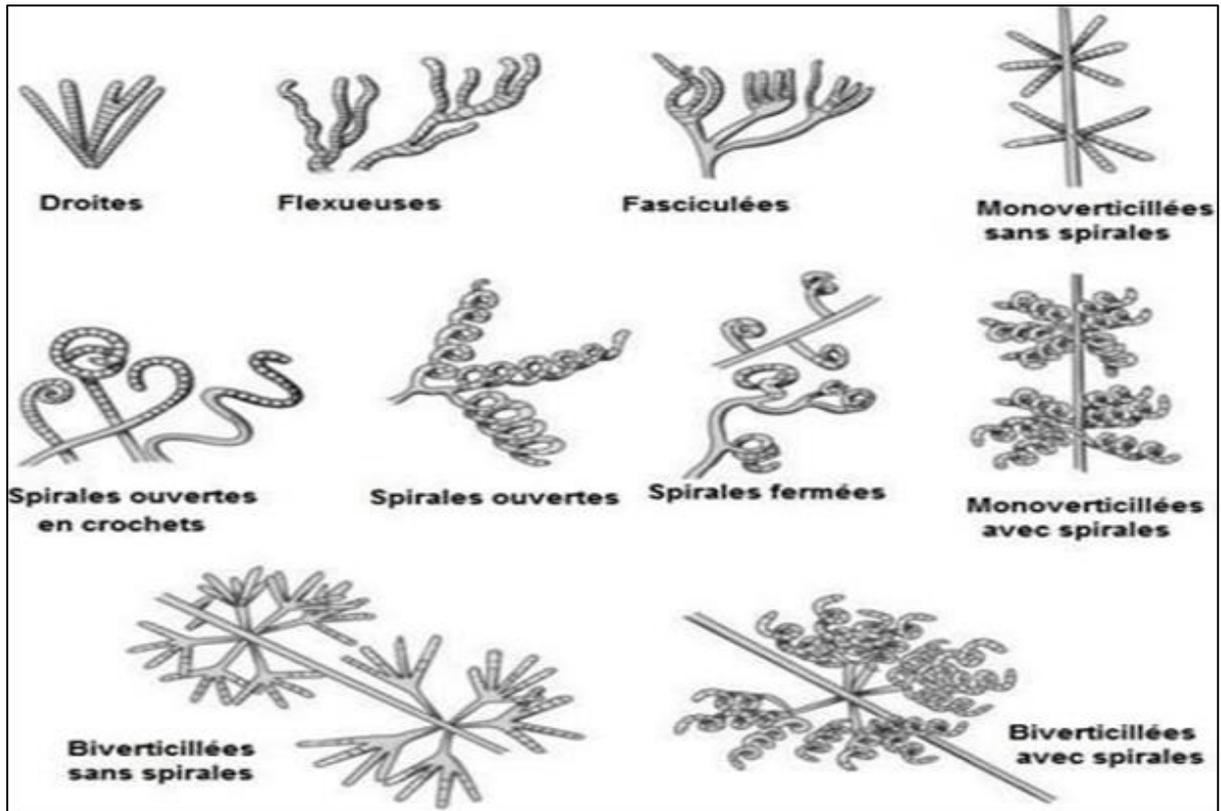


Figure 5 : Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de *Streptomyces* (Goodfellow *et al.*, 2012).

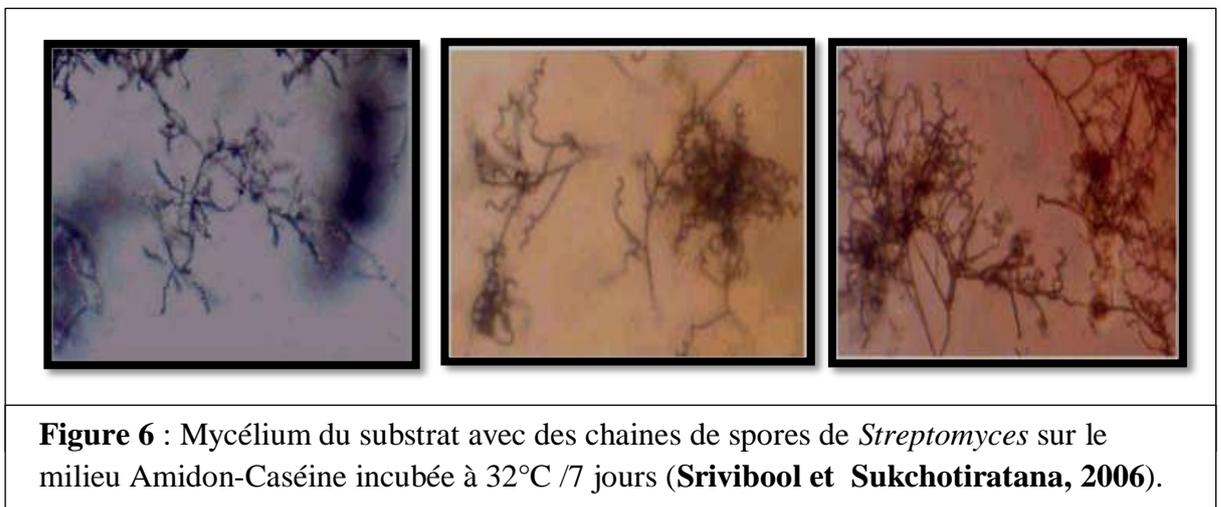


Figure 6 : Mycélium du substrat avec des chaînes de spores de *Streptomyces* sur le milieu Amidon-Caséine incubée à 32°C /7 jours (Srivibool et Sukchotiratana, 2006).

3.2. Critères chimiques (chimiotaxonomie) :

Ces critères consistent en la détermination de la composition cellulaire en acides aminés pariétaux, en glucides totaux, en phospholipides, en ménaquinones et en acides gras membranaires, et également en acides mycoliques pariétaux (Toumatia, 2015).

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

La muréine, ou peptidoglycane, est un composant majeur de la paroi des bactéries à Gram +, dont les actinobactéries. L'analyse des acides aminés qui la constituent est utilisée pour déterminer des chimiotypes. Deux acides aminés sont taxonomiquement très importants pour les actinobactéries mycéliennes, l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous deux formes, LL ou DL (méso) selon les genres et la glycine qui peut être présente ou absente. Cette dernière forme des liaisons "ponts" entre les sous-unités peptidiques de la muréine (Becker *et al.*, 1964 et 1965; Yamaguchi, 1965 ; Labeda *et al.*, 1984). Chez certaines actinobactéries non mycéliennes, le DAP est remplacé par la lysine ou bien par l'ornithine ou encore par l'acide diaminobutyrique (Saker, 2015).

3.2.2. Composition cellulaire en sucres :

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs. Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinomadura* et *Streptosporangium*. Les *Streptomyces* et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des *Actinoplanes* et du genre *Micromonospora*. (Lechevalier et Lechevalier, 1970). La figure 7 représente une clé d'identification, basé sur la composition cellulaire en acides aminés et en sucres.

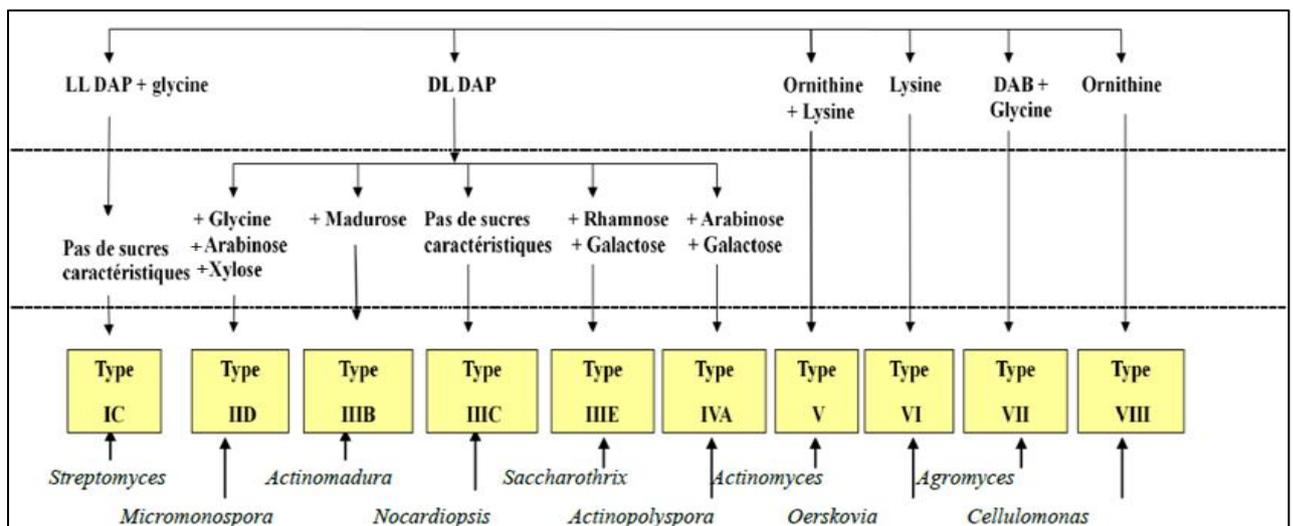


Figure 7 : Chimio-types rencontrés chez les actinobactéries.

Note: +: présent, Gly: glycine, DAP: acide diaminopimélique, DAB: acide diaminobutyrique.

- I, II, III et IV sont définis par (Becker *et al.*, (1965), Yamaguchi (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970)) en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diaminopimélique et la présence ou non de glycine.

- A, B, C, D et E sont définis par (Lechevalier et Lechevalier (1970), Labeda *et al.*, (1989) et Stackebrandt *et al.*, (1994) en se basant sur la présence ou non des sucres suscités.

3.2.3. Constituants membranaires et pariétaux (Lipides) :

Chez certains genres d'actinobactéries, la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour leur identification. 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. Les lipides taxonomiquement importants peuvent être répartis en trois groupes : les lipides contenant une partie polaire (phospholipides), les ménaquinones, les acides gras et parfois les acides mycoliques (**Lechevalier et Lechevalier, 1980 ; Collin et al., 1977**). Les lipides qui sont taxonomiquement importants sont les suivants :

3.2.3.1. Phospholipides

La composition membranaire en phospholipides est l'un des caractères les plus importants. Elle permet de distinguer entre eux la plupart des genres ayant le même chimiotype. En fonction de cette composition, on a divisé les actinobactéries en 5 types de phospholipides : PI à PV (**Lechevalier et al., 1977**) (Tableau 2).

Tableau 2 : Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les actinobactéries (Lechevalier et al., 1977)					
Type de phospholipides	PE	PC	PG	PGI	Exemples
PI	-	-	-	V	<i>Actinomadura.</i>
PII	+	-	-	+	<i>Streptomyces, Pseudonocardia.</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiopsis, Amycolatopsis.</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Nocardia, Nonomuraea.</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia.</i>

Note : PE : phosphatidyléthanamine, PC : phosphatidylcholine, PG : phospholipides contenant la glucosamine, PGLY : phosphatidylglycérol, V : variable :(+/-).

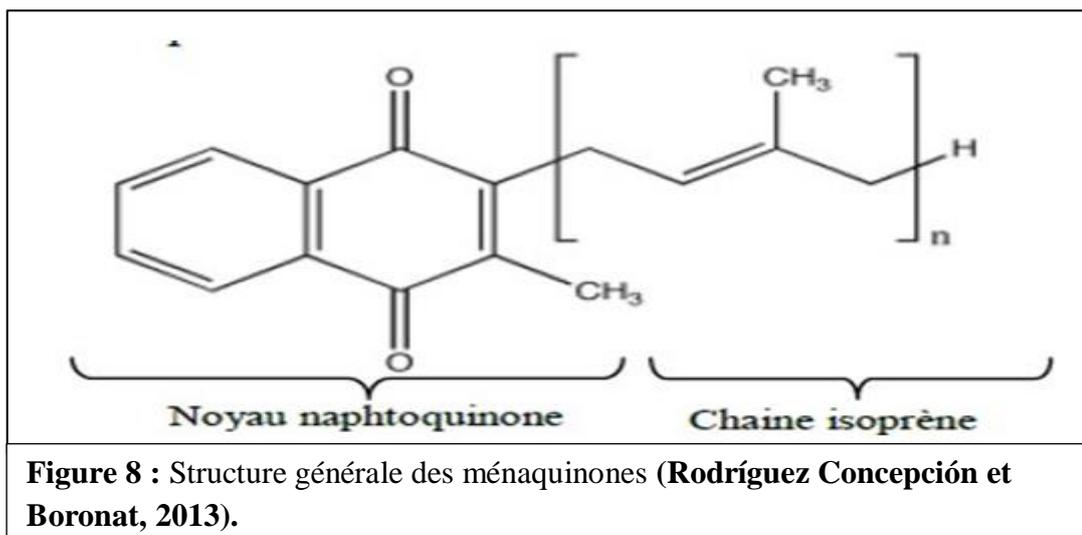
3.2.3.2. Acides gras :

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

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

3.2.3.3. Ménaquinones :

Les ménaquinones sont des composés lipidiques membranaires constitués d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne aliphatique contenant des unités isoprènes. Elles sont classées suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (Collins *et al.*, 1980). La variation dans la longueur et le degré de saturation de la chaîne latérale des ménaquinones leur a donné une importance dans la chimiotaxonomie. Ex : ménaquinone MK-10(H₂) présente chez *Nocardiosis*: ménaquinone avec dix unités isoprènes dont deux sont hydrogénées. Leur structure générale est la suivante : (Collins, 1985).



3.2.3.4. Acides mycoliques :

Les acides mycoliques sont des acides gras 2-alkyl 3-hydroxy de haut poids moléculaire à longue chaîne (jusqu'à 90 atomes de carbone) trouvés dans des représentants de *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordona*, *Myobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Turicella* et *Tsukumurellu* (Ruimy *et al.*, 1995). Mais la détection des acides mycoliques réduit fortement le nombre de parents possibles (Wang et Jiang, 2016).

Ils sont importants uniquement pour différencier certaines actinobactéries ayant le chimiotype IVA (Mordarska *et al.*, 1972), comme par exemple le genre *Nocardia* (46-64 atomes de carbone) (Goodfellow *et al.*, 2012).

3.3. Critère physiologique et taxonomie numérique:

Les tests physiologiques utilisés consistent en des tests de dégradation de différents composés organiques (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents), ainsi que la tolérance au pH, à la température, à la salinité, etc. Lorsque les tests physiologiques sont très nombreux, les

résultats deviennent difficilement exploitables. Ce qui a amené les systématiciens à appliquer durant une longue période la taxonomie numérique aux actinobactéries (**Goodfellow et al., 1990**). Cette technique a apporté plus de clarté dans la reconnaissance des espèces et les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus sur le genre *Streptomyces*. En effet, le nombre d'espèces de ce genre, qui était de 463 a été réduit à 142 (**Williams et al., 1989**).

3.4. Critères moléculaires

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

3.4.1. Analyse des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S :

Woese et Fox (1977) soulignent que l'évolution a un rythme quasi indépendant des changements de phénotypes (théorie neutraliste de l'évolution). Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique ou phylogénétique en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles. Woese (1987) a ainsi choisi l'ADNr 16S en tant qu'outil pour la classification phylogénétique et l'identification bactérienne pour plusieurs raisons:

- ❖ Sa présence est universelle et y accomplit le même rôle chez tous les organismes.
- ❖ Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient et permettent de comparer des espèces très proches sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés (**Figure 9**).
- ❖ Il a évolué lentement au cours du temps, vraisemblablement en raison de son rôle dans la physiologie bactérienne.
- ❖ Il n'est pas le résultat de transferts latéraux.
- ❖ Il est préféré au 5S et au 23S en raison de sa taille moyenne et sa structure secondaire moins marquée. Sa séquence est suffisamment longue pour réaliser des comparaisons statistiquement cohérentes (**Saker, 2015**).

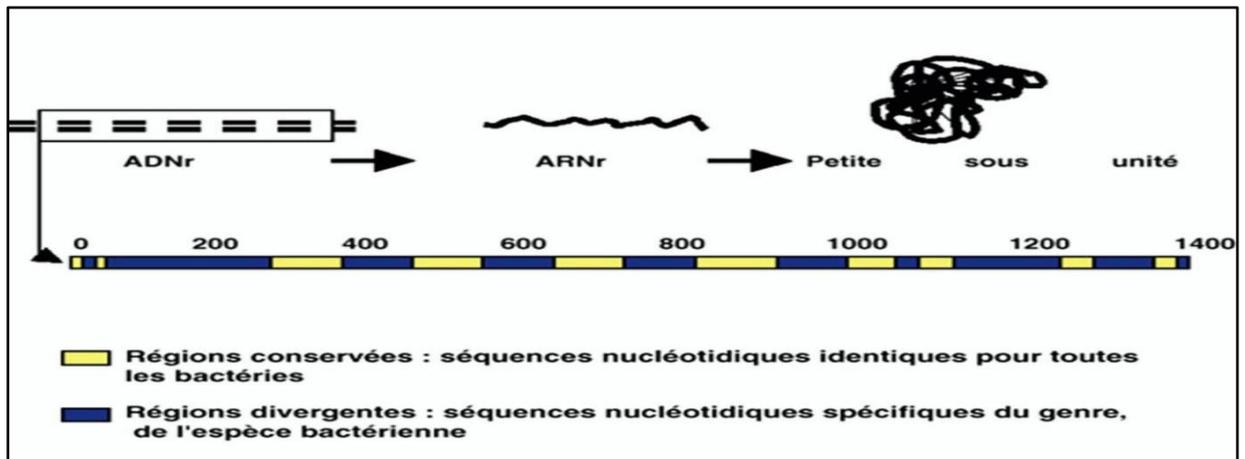


Figure 9 : Organisation du gène codant pour l'ARNr 16S. (Stackebrandt *et al.*, 1983)

3.4.2 Hybridation ADN-ADN et détermination du pourcentage de guanine-cytosine :

L'hybridation ADN-ADN est l'une des principales procédures d'identification de nouvelles espèces. Généralement, l'hybridation ADN-ADN (DDH) est nécessaire lorsque les souches partagent plus de 97% de similitude de séquence génétique de l'ARNr 16S. Si une nouvelle souche de recherche montre ce degré élevé de similitude avec plus d'une espèce connue, la DDH doit être effectuée avec toutes les souches de type pertinentes pour s'assurer qu'il y a suffisamment de dissemblance pour soutenir la classification de la ou des souches en tant que nouveau taxon. En 1987, le système international, Comité International de Bactériologie Systématique ICSB, à condition que si la valeur de DDH est supérieure à 70% ou que la différence de température de fusion de la chaîne moléculaire hybride soit inférieure à 2°C, les deux souches devraient être une espèce (Xiu *et al.*, 2016).

Chez les bactéries, le pourcentage en guanine et cytosine (G+C) varie entre 25 et 78%. La détermination de ce pourcentage doit être effectuée pour l'espèce-type d'un nouveau genre, mais devient facultative si l'espèce découverte appartient à un genre déjà décrit (Euzéby, 2002).

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

4. Types des Actinobactéries :

4.1. Actinobactéries Thermophiles :

Nombre d'études ont été menées par les chercheurs pour confirmer l'existence d'actinobactéries du sol extrémophiles et extrêmement tolérantes (tolérantes aux acides et aux alcalis, psychrotolérantes et thermotolérantes, halotolérantes et haloalkalitolerantes ou xérophiles). Les actinobactéries mésophiles peuvent se développer à une température optimale de 20°C à 42°C, parmi lesquelles il existe des espèces thermotolérantes qui peuvent survivre à 50°C. Les actinobactéries modérément thermophiles ont une croissance optimale à 45°C–55°C, (Jensen *et al.*, 2015) alors que les Actinobactéries strictement thermophiles se développent à 37°C–65°C avec la température optimale à 55°C–60°C. Des températures d'incubation de 28°C, 37°C et 45°C sont considérées comme optimales pour l'isolement des actinobactéries mésophiles, thermotolérantes et modérément thermophiles du sol. Les thermoactinomies, qui sont actuellement exclues de l'ordre des Actinomycétales, sont décrites comme des formes thermophiles en fonction de leurs caractéristiques génétiques phénotypiques et moléculaires, ainsi que parmi certaines espèces de *Thermomonospora*, *Microbispora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora* et *Streptomyces* (Jiang et Xu, 1993).

4.2. Actinobactéries Acidophiles :

Les actinobactéries acidophiles, qui sont courantes dans les habitats terrestres tels que les forêts acides et les sols de drainage minier, se développent dans une plage de pH d'environ 3,5 à 6,5, avec des taux optimaux à pH de 4,5 a été démontré que les actinobactéries acidophiles forment systématiquement deux taxons agrégés distincts (à savoir les groupes de grappes acidophiles neutrotolérantes et strictement acidophiles) sur la base de données phénétiques numériques; les membres des deux groupes partagent des propriétés morphologiques et chimiotaxonomiques communes. De plus, certains membres du groupe strictement acidophile forment un taxon distinct, comme le genre *Streptacidiphilus*, qui a été attribué à la famille révisée des *Streptomycetaceae*, avec les genres *Kitasatospora* et *Streptomyces* (Ranjani *et al.*, 2016).

4.3. Actinobactéries Halophiles :

Les actinobactéries halophiles sont classées en différents types en fonction de leur croissance dans des milieux contenant différentes concentrations de sel. Les halophiles extrêmes poussent mieux dans des milieux contenant 2,5 à 5,2 M de sel, tandis que les halophiles extrêmes limites poussent mieux dans des milieux contenant 1,5 à 4,0 M de sel, les halophiles modérés poussent mieux dans des milieux contenant 0,5 à 2,5 M de sel, et enfin les halotolerants qui ne présentent pas un besoin absolu de sel pour la croissance mais poussent bien jusqu'à des concentrations de sel souvent très élevées et tolèrent au moins 100 g/l de sel (équivalent à 1,7 M de NaCl). L'eau de mer, les sols salins,

les lacs salés, les saumures et les habitats salins alcalins sont considérés comme les meilleurs habitats pour isoler les actinobactéries halophiles. Généralement, la plupart des actinobactéries halophiles ont été isolées de sols salins. Les actinobactéries halophiles isolées des milieux marins sont assignées à quelques genres, dont *Micromonospora*, *Rhodococcus* et *Streptomyces*. L'autre groupe comprend *Dietzia*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporange*, *Nonomurée*, *Williamsia* et *Verrucosispora*. (Riedlinger et al., 2004).

4.4. Actinobactéries Endophytes :

Les actinobactéries endophytes sont définies comme celles qui habitent la partie interne des plantes, ne causant apparemment aucun changement visible à leurs hôtes. Ces actinobactéries jouent un rôle spécifique, par exemple en protégeant les plantes hôtes contre les insectes et les maladies. Les actinobactéries endophytes constituent une grande partie de la rhizosphère, qui se trouvent également à l'intérieur de plantes dont les espèces largement étudiées sont du genre *Frankia*, des bactéries fixatrices d'azote de plantes non légumineuses, et quelques espèces du genre *Streptomyces* qui sont phytopathogènes. En général, les Actinobactéries endophytes comprennent les *Streptomyces*, mais les genres *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Kitasatospora*, *Pseudonocardie*, *Microbispora*, *Kibdelosporangium*, *Actinopolyspora*, *Nocardioides*, *Brevibacterium*, *Actinomadura*, *Glycomyces* *Plantactinospora*, *Polymorphospora*, *Promicromonospora* et *Streptosporangium* sont également trouvés dans les plantes, telles que *Palicourea longifolia*, *Calycophyllum acreanum*, *Monstera spruceana*, *Croton lechleri*, *Cantua buxifolia*, *Siparuna crassifolia* et *Eucharis cyaneosperma* (Ranjani et al., 2016).

4.5. Actinobactéries Symbiotiques :

Environ 15% de l'azote mondial est fixé naturellement par les relations symbiotiques entre diverses espèces de *Frankia* appartenant à la famille des Actinobactéries. Les plantes qui forment des relations symbiotiques avec *Frankia* sont appelées plantes *actinorhizales*. Les chercheurs ont trouvé plus de 160 plantes qui ont des actinobactéries comme hôtes, notamment des aulnes, des oliviers russes, des baies, des fougères douces, des broussailles et des rosiers des falaises. Les *Frankia* ont la capacité de fournir la plupart ou la totalité des besoins en azote de la plante hôte. De nombreuses espèces de *Frankia*, y compris les isolats de *Casuarina*, forment des vésicules réductrices d'azote (NIR) *in vitro* et chez planta. Ces bactéries fixatrices d'azote et leurs plantes hôtes sont souvent des espèces pionnières sur de jeunes sols déficients en azote et perturbés tels que les moraines, les coulées volcaniques et les dunes de sable (Thajuddin et al., 2015).

4.6. Actinobactéries Endosymbiotiques

Un endosymbionte est tout organisme qui vit dans le corps ou les cellules d'un autre organisme. Le processus d'endosymbiose est parfois obligatoire, c'est-à-dire que l'endosymbionte ou l'hôte ne peuvent survivre sans l'autre. Les membres du phylum des Actinobactéries ont été identifiés comme des membres abondants de communautés microbiennes associées à des éponges. *Mycobacterium* ainsi que les espèces *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Brachybacterium*, *Rubrobacter*, *Streptomyces*, *Dietzia*, *Salinispora*, *Actinokineospora*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, *Nocardiopsis* et *Rothia* vivent sous forme d'endosymbiontes dans les éponges marines *Callyspongia aff.* Les espèces de ce genre sont endémiques des États-Unis, *Dysidea avara*, *Amphimedon sp.*, et *Negombata magnifica*. Cependant, les endosymbiontes actinobactériens ont également été signalés chez d'autres groupes d'animaux, tels que *Hylobates hoolock*, *Rhinopithecus roxellanae*, *Rhinopithecus bieti*, *Panthera tigris altaica*, *Panthera tigris tigris*, *Panthera tigris amoyensis*, *Ailurus fulgens*, *Cavnilvara zirsidae*, *Ursus thibetanus*, *Cervus elaphus*, *Elaphurus davidianus* et *Vicugna pacos* (Ranjani et al., 2016).

4.7. Actinobactéries Intestinales

Bien que les actinobactéries se trouvent dans divers habitats divers, certaines sont également connues pour former des associations intimes avec des invertébrés et des vertébrés. Les interactions symbiotiques sont essentielles principalement pour la survie et la reproduction car elles jouent un rôle crucial dans la nutrition, la désintoxication de certains composés, la performance de croissance et la protection contre les bactéries pathogènes. De nombreuses études ont montré que certaines espèces symbiotiques d'actinobactéries, c'est-à-dire les probiotiques, contrôlent les maladies bactériennes du bétail, de la volaille et de l'aquaculture. Ils participent également à la santé de l'hôte en convertissant les aliments en biomasse microbienne et en produits finaux de fermentation pouvant être utilisés par l'hôte animal (Tan et al., 2009). Ont isolé des *Streptomyces*, des *Nocardiopsis* et des *Oerskovia* à partir d'excréments de chèvre sains. De même, Latha et Dhanasekaran ont isolé 87 cultures d'Actinobactéries à partir de différentes matières fécales de chèvre et de poulet collectées à divers endroits dans les districts de Pudukkottai et de Tiruchirappalli, au Tamil Nadu, parmi lesquelles 45 isolats ont été sélectionnés pour le dépistage de l'activité antibactérienne et de la production d'enzymes digestives extracellulaires. La capacité du probionte *Streptomyces sp.* Le JD9 issu de l'intestin de poulet possède toutes les caractéristiques nécessaires pour satisfaire le probionte actinobactérien indigène pour une production accrue de poulets de chair (Ranjani et al., 2016).

5. Cycle de développement d'actinobactérie

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

Il débute par la germination d'une spore, processus qui nécessite la présence des ions de calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes qui se ramifient et non fragmenté et se développent par croissance apicale (**O'Gara et al., 2008**) (Figure 10). Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, qui sont des agents de dissémination (**Kim et al., 2004 ; Smaoui, 2010**). Ces spores naissent par séparation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress d'environnement. 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. Le mycélium du substrat s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment-là que les composés médicalement utiles sont synthétisés, et on les appelle métabolites secondaires (**Smaoui, 2010**).

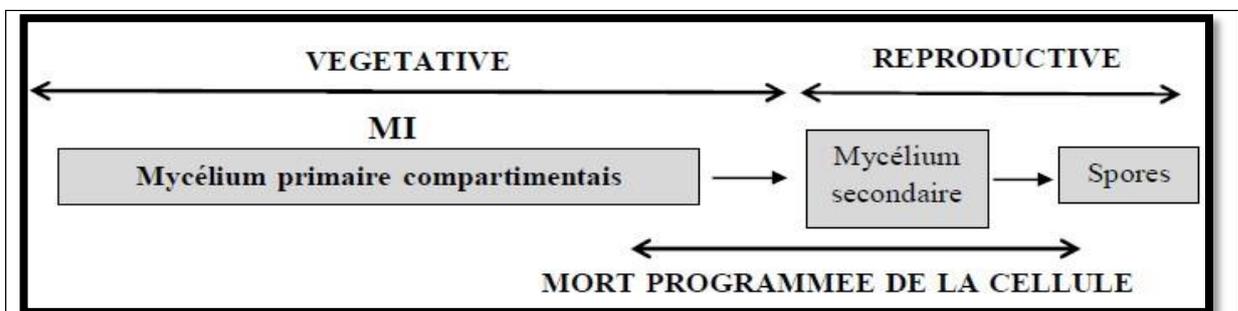


Figure 10 : Schéma du cycle de vie de *Streptomyces* dans les conditions naturelles (**Manteca et al., 2010**).

Le mycélium aérien émerge par la réutilisation de composés assimilés par le mycélium végétatif tels que l'ADN, les protéines ainsi que des composés stockés résultants de la lyse du mycélium de substrat (**Ou et al., 2008**). Lorsque la croissance du mycélium aérien s'arrête, contrairement au mycélium végétatif, des septas sont formés à des intervalles réguliers le long de l'hyphe formant des compartiments uni-génomiques. Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative. Les actinobactéries sont immobiles, excepte pour les spores de certains genres (*Actinoplan, Spirillospora....etc.*) (**Prescott et al., 2010**).

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

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

6. Ecologie des actinobactéries :

Les actinobactéries colonisent une large variété d'habitats naturels comme le montre le **tableau 3**, elles sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Elles sont présentes dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés (Kitouni, 2007).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Ils représentent 80 à 95% du total des actinobactéries après *Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora*. Les autres genres ne constituent qu'une fraction minime et sont parfois peu fréquents ou même assez rares (Boubetra *et al.*, 2013).

Tableau 3 : Distribution des actinobactéries dans la nature (Larpen, 1989).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

6.1. Aperçu général sur l'écologie des actinobactéries :

Les actinobactéries sont généralement saprophytes, mais quelques-uns sont pathogènes pour les plantes tel que *Streptomyces scabies*, agent de la galle de la pomme de terre ou encore pathogènes pour l'homme, comme *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* et certaines espèces de *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Actinomyces* ou encore *Streptomyces* (Peltola *et al.*, 2001). La grande capacité d'adaptation des actinobactéries aux différentes conditions environnementales et leur grande variabilité métabolique leur a permis d'être répartis à l'échelle universelle dans presque tous les écosystèmes, avec toutefois une certaine préférence pour le sol qui demeure le réservoir le plus riche (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Ainsi, on rencontre les actinobactéries dans les sols où leur densité est de l'ordre de 10^6 à 10^7 UFC par gramme de sol sec, soit 10 à 20% de la microflore tellurique totale (Dommergues et Mangenot, 1970). Ils sont présents aussi dans les aliments, l'atmosphère, le fumier, les eaux de mer, les pailles, les graines de céréales, les résidus fibreux de canne à sucre, le pollen des plantes, les débris végétaux, les litières, les sols glaciés de l'Arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols des régions industrielles polluées par le pétrole ou des métaux lourds, etc. (Goodfellow et Williams, 1983).

Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le premier cité étant nettement prépondérant : 80 à 95% du total des actinobactéries (Goodfellow et Williams, 1983).

6.2. Répartition des actinobactéries dans le sol :

Le sol représente le réservoir le plus important en actinobactéries mycéliennes (10 à 20% de la microflore tellurique) (Goodfellow et Williams, 1983; Theilleux, 1994). L'abondance des actinobactéries mycéliennes au niveau du sol est influencée par plusieurs facteurs physico-chimiques tels que la nature et la richesse en matières organiques, la température, le pH, la profondeur, l'aération et l'humidité. Leur répartition verticale va de la surface à plus de 2 mètres de profondeur avec un optimum entre 2 et 15 cm (Breton *et al.*, 1989 ; Sabaou *et al.*, 1998). Ce sont généralement des bactéries aérobies strictes, à l'exception de certaines espèces qui sont anaérobies facultatives (*Oerskovia*) microaérophiles ou anaérobies strictes (*Actinomyces* et *Agromyces*) (Lechevalier, 1972). Les actinobactéries préfèrent une humidité réduite de l'ordre de 5 à 25%. A l'instar des autres bactéries du sol, la majorité des actinobactéries est mésophile et neutrophile. Certaines espèces sont acidophiles ou basophiles et d'autres sont thermophiles ou encore halophiles (Meklat *et al.*, 2011).

7. Importance des Actinobactéries :

Les actinobactéries sont bien reconnues pour leur production de métabolites primaires et secondaires qui ont des applications importantes dans divers domaines. Ils sont également une source prometteuse d'une large gamme d'enzymes importantes, produites à l'échelle industrielle. Une grande partie des antibiotiques sur le marché est obtenue à partir d'actinobactéries. Ils produisent des inhibiteurs enzymatiques utiles pour le traitement du cancer et des immunomodificateurs qui améliorent la réponse immunitaire. Ils ont la capacité de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aliphatiques et aromatiques (Figure 11) (Ranjani *et al.*, 2016).

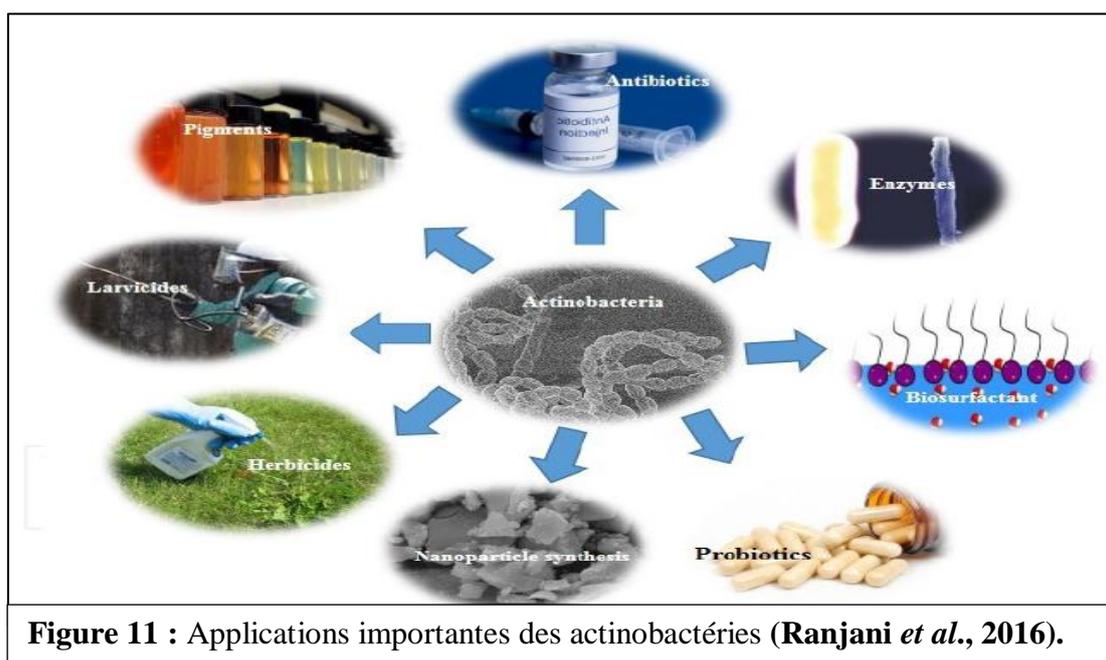


Figure 11 : Applications importantes des actinobactéries (Ranjani *et al.*, 2016).

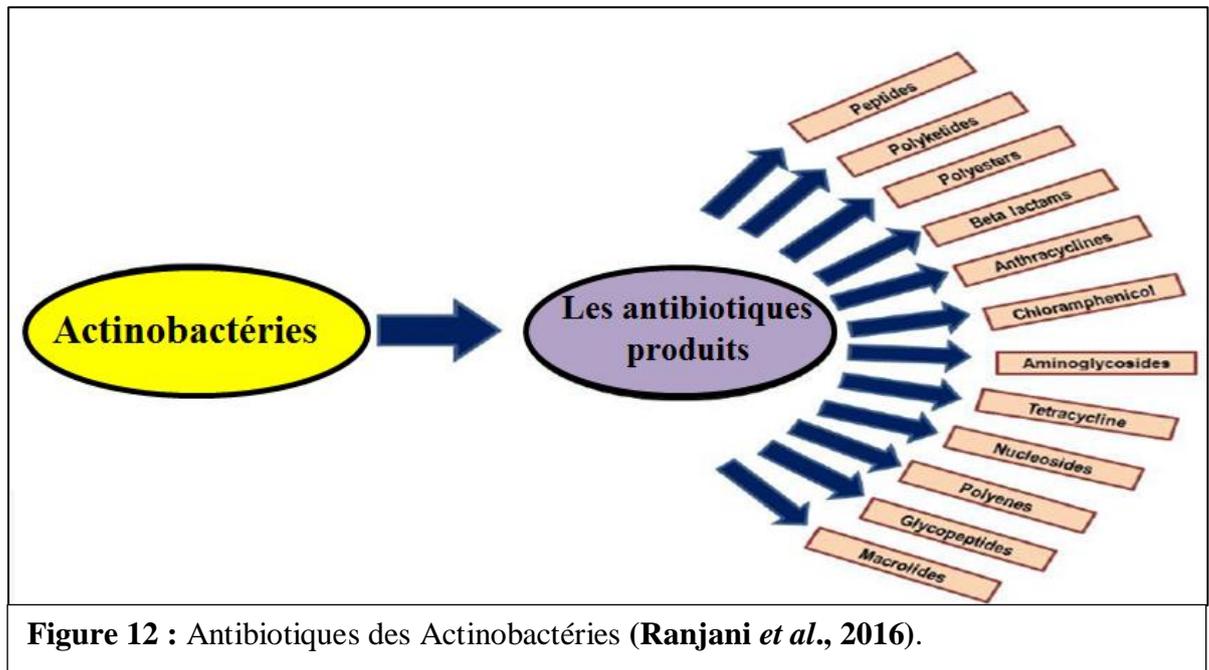
7.1. Importance dans le domaine industriel :

7.1.1. Production d'antibiotiques :

Les actinobactéries jouent un rôle important dans la production de divers médicaments extrêmement importants pour notre santé et notre nutrition. Récemment, les maladies dues aux bactéries pathogènes multirésistantes augmentent vigoureusement, et la recherche de nouveaux antibiotiques est donc efficace contre les agents pathogènes multirésistants. Il a été observé que des produits naturels ayant des structures nouvelles possèdent des activités biologiques utiles (Dancer, 2004).

La nature reste toujours la source propice la plus riche et la plus polyvalente pour de nouveaux antibiotiques. Comme déjà mentionné, l'un des principaux problèmes de santé est la résistance aux antibiotiques. Une approche pour résoudre ce problème consiste à rechercher de nouveaux antibiotiques avec un nouveau mécanisme d'action. La figure 12 montre qu'une majorité

d'antibiotiques sont dérivés de microorganismes, en particulier de l'espèce Actinobacteria. Près de 80% des antibiotiques dans le monde sont connus pour être dérivés d'Actinobactéries, principalement des genres Streptomyces et Micromonospora (**Hassan *et al.*, 2011**).



7.1.2. Production d'autres substances :

Après les antibiotiques, les enzymes représentent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les actinobactéries. Certaines sont utilisées en industrie agro-alimentaire (ex : glucose isoméras), en thérapeutique (cholestérol oxydases), en vétérinaire, comme additif nutritionnel pour l'élevage ou encore en industrie chimique, comme les protéases ajoutées aux détergents (**Moreira, 2002**).

Des antihistaminiques, des immunosuppresseurs (utilisés dans la transplantation des organes), des antiviraux, des substances utilisées en neurothérapie (trouble du système nerveux central et dégénérescence des neurones) etc., sont également produits (**Kim *et al.*, 1998**).

- **Autres rôles**

Les autres rôles d'applications des actinobactéries concernent la dégradation des hydrocarbures et du phénol dans les déchets des industries textiles et des teintures (**Bhathena *et al.*, 2002**).

Certaines espèces d'actinobactéries se sont révélées capables de dégrader ou de transformer des toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et de réduire ainsi leur teneur dans les produits alimentaires (**Holzappel *et al.*, 2002**).

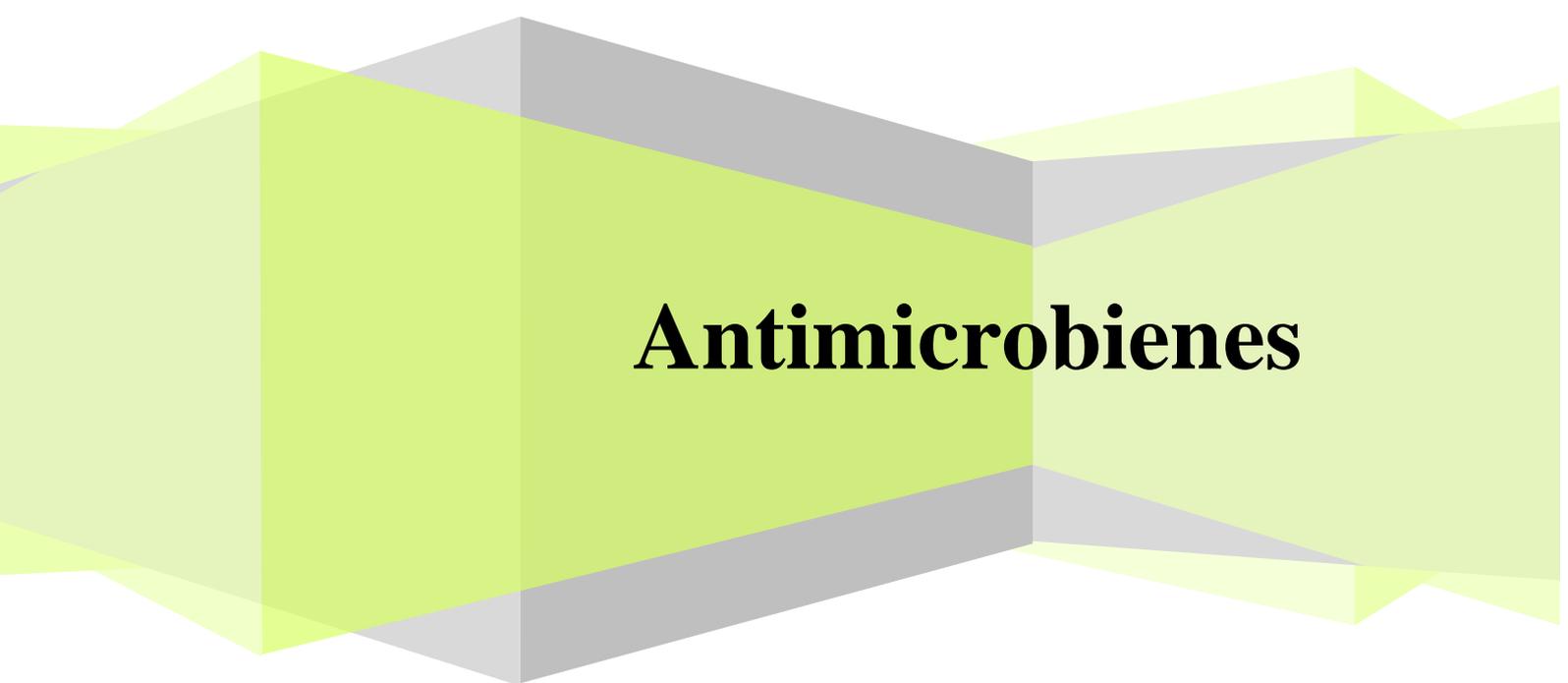
7.2. Importance dans le domaine agronomique

Les actinobactéries sont très utiles dans la biodégradation et le recyclage de la matière organique dans le sol. Ils interviennent dans la lutte biologique contre les maladies des plantes, et ce, grâce à leur grande aptitude à produire différentes substances inhibitrices vis-à-vis des autres microorganismes telluriques (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Les actinobactéries jouent aussi un certain rôle dans la fertilité des sols car ils possèdent la capacité de dégrader les matières organiques complexes telles que la lignine, la cellulose, la chitine, la kératine, etc., que d'autres microorganismes ne peuvent utiliser (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Le genre *Frankia* est très connu en foresterie pour son rôle dans la fixation d'azote atmosphérique en symbiose dans les nodules racinaires de certains arbres dicotylédones (autres que les légumineuses) comme le casuarina, l'orme, l'aulne, etc (**Becking, 1974; Lechevalier, 1981**).

Chapitre II :

Antimicrobiennes



1. ANTIBIOTIQUES :

1.1. Définition:

Sur base de l'étymologie du mot « antimicrobien» (du grec *anti* : contre, *mikros* : petit et *bios* : vie), on définit un composé de ce type comme toute substance capable d'agir contre la vie des microorganismes. L'adjectif antibiotique (du grec *anti* : contre, *biotikos* : concernant la vie) utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, se précisera plus tard, comme une substance chimique produite par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voir même de détruire d'autres microorganismes. Les composés utilisés à des fins thérapeutiques lors de maladies bactériennes chez l'homme et les animaux sont fréquemment appelés, par les professionnels de la santé ainsi que par les profanes, antibiotiques (**Muylaert et Mainil, 2012**).

Les antibiotiques sont des médicaments particuliers car ils agissent sur les bactéries présentes chez le sujet traité. Les utiliser conduit à réduire globalement leur efficacité dans le temps du fait de la capacité d'adaptation des bactéries. La réduction de leur utilisation passe par la diminution des prescriptions à mauvais escient et par le développement d'une prescription vétérinaire raisonnée. Comprendre les mécanismes de résistance aux antibiotiques, les surveiller, communiquer sur une réduction des usages, doivent nous permettre de continuer à les utiliser demain lorsqu'ils sont nécessaires pour sauver des vies (**Sanders, 2011**).

1.2. Classification:

Les antibiotiques ont été regroupés en familles (Tableau 4) dont la distinction repose sur la structure chimique et les modes d'action. Ces familles, qui actuellement sont au nombre de 8 auxquelles il faut ajouter les sulfamides, groupent des substances dont les mécanismes d'action et le spectre d'activité sont identiques. Ainsi, les β -lactamines, qui comprennent la pénicilline et les antibiotiques apparentés, agissent toutes au niveau de la paroi, et seulement chez certaines espèces bactériennes (**Khalil, 2016**).

D'autres familles inhibent les synthèses protéiques, d'autres la régulation des transferts d'eau et d'électrolytes. Les Sulfamides sont des analogues de structure d'un métabolite intermédiaire auquel ils se substituent dans une réaction biochimique (**Khalil, 2016**).

Tableau 4 : Classifications d'antibiotique selon la structure chimique (Berdy *et al.*, 1987).

Familles d'antibiotiques		Sous-familles	Exemples
1	Glucides et apparentés	Glucides purs	Nojirimycine.
		Aminoglycosides	Streptomycine, gentamicine, kanamycine.
		G-Glycosides et N-glycosides	Vancomycine, streptothricine.
		Glycolipides	Moenomycine.
2	Lactones macrocycliques	Macrolides	Spiramycine, érythromycine.
		Polyènes	Amphotéricine, nystatine, candidine.
		Macrotétrolides	Tetranactine, nonactine.
		Macrolactames	Rifamycine.
3	Quinones et apparentés	Polycycliques accolés linéairement	Tétracyclines.
		Dérivés naphtoquinoniques	Anthracyclines.
		Dérivés benzoquinoniques	Mitomycine.
4	Acides aminés et peptides	Dérivés d'acides aminés	Cyclosérine, pénicilline, nocardine.
		Homopeptides	Bacitracine, cyclosporine.
		Hétéropeptides	Aculéacine.
		Peptolides	Valinomycine.
5	Hétérocycles à azote	Hétérocycles non accolés	Caerulomycine, mildiomyce.
		Hétérocycles accolés	Phénazines, herbicidine.
6	Hétérocycles à oxygène	Polyéthers	Monensine, nigéricine.
7	Composés alicycliques	Dérivés du cycloalcane	Cycloheximide.
		Terpènes	Acide marasmique.
8	Aromatiques	Dérivés benzéniques	Chloramphénicol.
		Aromatiques accolés	Griséofulvine.
		Composés non benzéniques	Fusariocine.
9	Aliphatiques	Dérivés des alcanes	Élaiomycine.
		Dérivés d'acides carboxyliques	Cérulénine.
		Composés contenant du phosphore ou du soufre	Fosfomycine.

1.3. Mode d'action des antibiotiques:

Le mode d'action d'un antibiotique est en relation avec sa structure chimique. En général, à chaque classe d'antibiotique est associé un site d'action dans la cellule microbienne. Ce site peut être la paroi cellulaire, la membrane plasmique, les ribosomes ou les composants génétiques (**Driche, 2010**).

L'image suivante montre les principes mécanismes d'action de l'antibiotique (Figure 13).

➤ Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire:

Les antibiotiques qui inhibent la biosynthèse de la paroi cellulaire chez les bactéries étaient connus bien avant que la biochimie réelle des processus impliqués ne soit pas complètement élucidée dès 1962, (**Han et al., 1992**). Les cellules bactériennes sont entourées d'une paroi cellulaire en peptidoglycane, qui se compose de longs polymères de sucre. Le peptidoglycane subit une réticulation des brins de glycane par l'action des transglycosidases, et les chaînes peptidiques s'étendent des sucres dans les polymères et forment des réticulations, d'un peptide à l'autre. La partie D-alanyl-alanine de la chaîne peptidique est réticulée par des résidus de glycine en présence de protéines de liaison à la pénicilline (PBP). Cette réticulation renforce la paroi cellulaire. les β -lactames et les glycopeptides inhibent la synthèse de la paroi cellulaire (**Kapoor et al., 2017**).

➤ Inhibiteurs de la synthèse protéique:

La biosynthèse des protéines est catalysée par les ribosomes et les facteurs cytoplasmiques. Le ribosome bactérien 70S est composé de deux sous-unités ribonucléoprotéiques, les sous-unités 30S et 50S. Les antimicrobiens inhibent la biosynthèse des protéines en ciblant la sous-unité 30S ou 50S du ribosome bactérien (**Kapoor et al., 2017**).

➤ Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques:

Les fluoroquinolones (FQ) inhibent l'enzyme bactérienne ADN gyrase, qui entaille l'ADN double brin, introduit des supercoils négatifs et resserre ensuite les extrémités entaillées. Ceci est nécessaire pour éviter une surfusion positive excessive des brins lorsqu'ils se séparent pour permettre la réplication ou la transcription (**Kapoor et al., 2017**).

➤ Inhibiteurs de la voie métaboliques:

Chacun de ces médicaments inhibe des étapes distinctes dans le métabolisme de l'acide folique. Une combinaison de sulfates et de triméthoprime agissant à des étapes distinctes sur la même voie biosynthétique montre une synergie et un taux de mutation réduit pour la résistance (**Yoneyama et al., 2006**). Les sulfamides inhibent la dihydroptéroate synthase de manière compétitive avec une affinité plus élevée pour l'enzyme que le substrat naturel, l'acide p-amino benzoïque. Des agents tels

que le triméthoprime agissent à un stade ultérieur de la synthèse de l'acide folique et inhibent l'enzyme dihydrofolate réductase (Yoneyama *et al.*, 2006).

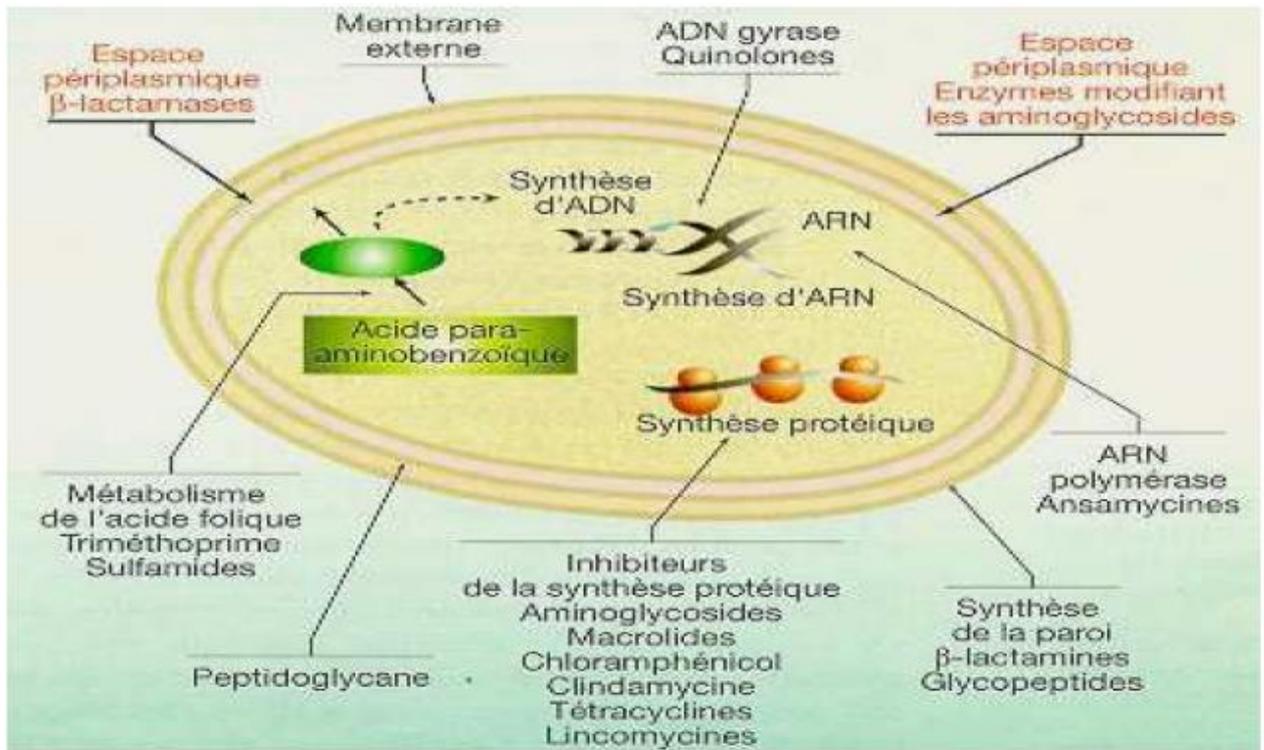


Figure 13 : Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques (Davies et Mazel, 1997)

1.4. Résistance bactérienne aux antibiotiques :

Un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se recoupent pas forcément. Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*) (Muylaert et Mainil, 2012). Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylo-génétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre, cultivées dans les mêmes conditions. Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place. (Muylaert et Mainil, 2012).

La figure 14 résume les types de résistance bactérienne aux antibiotiques.

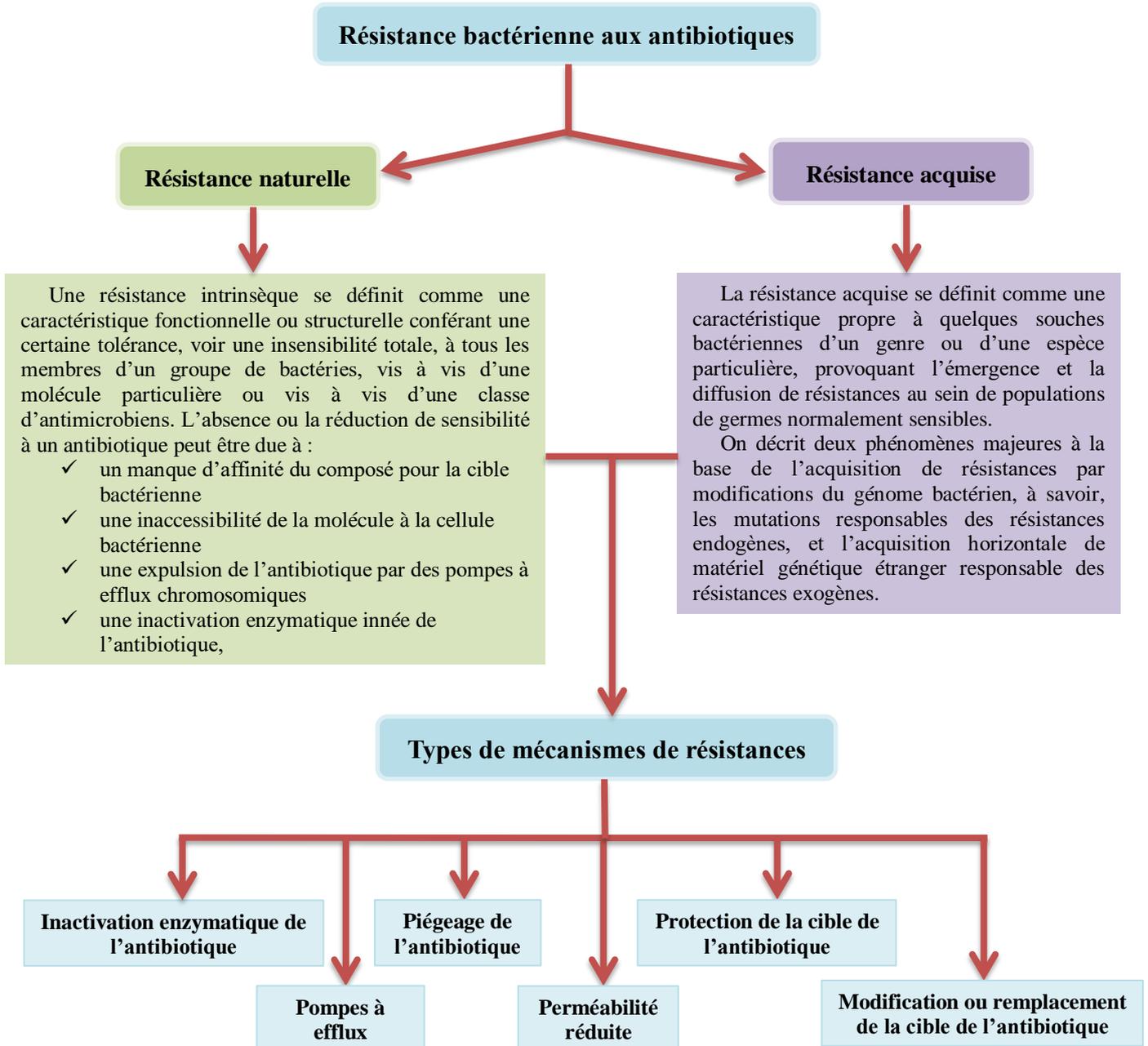
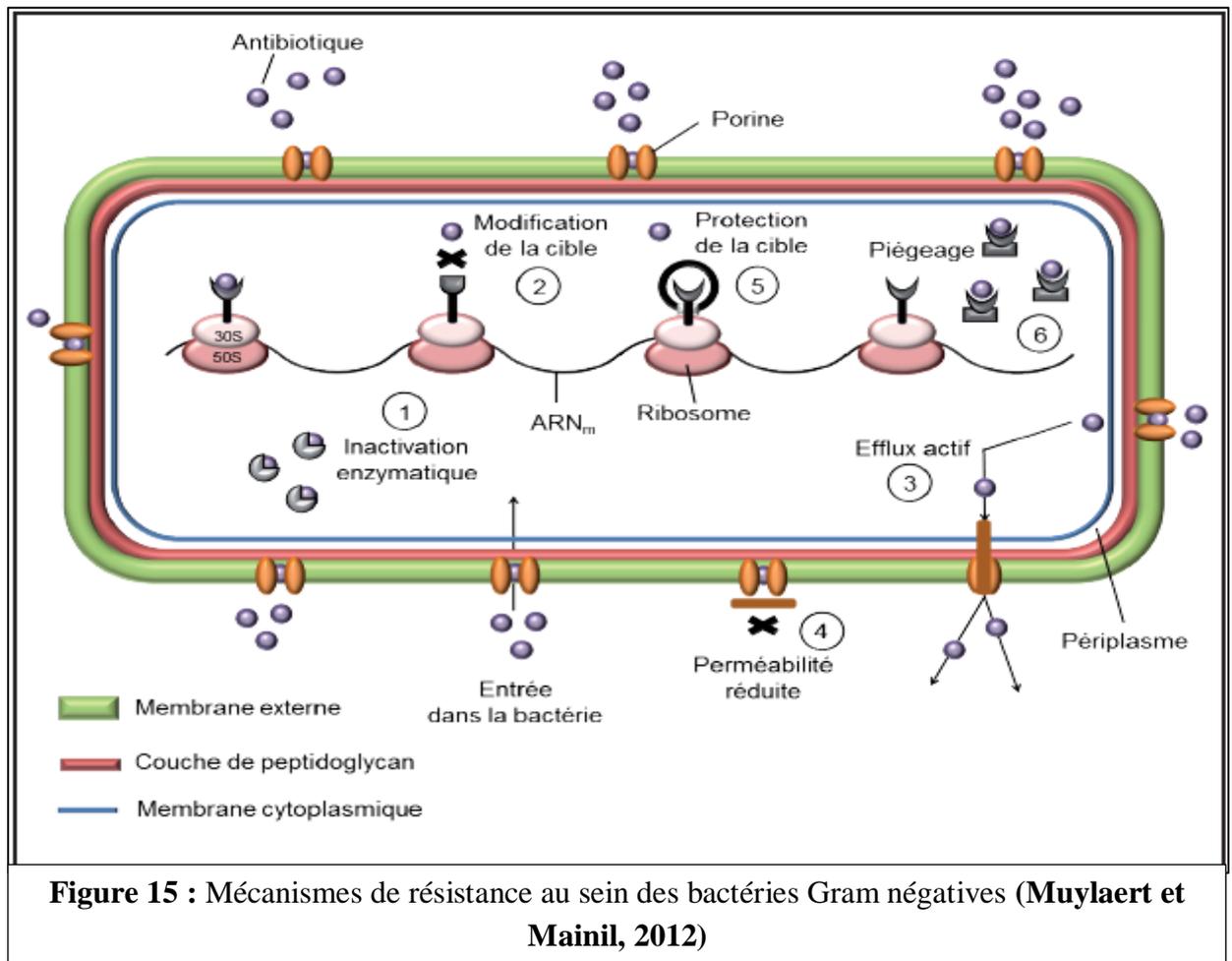


Figure 14: Les types de résistance bactérienne aux antibiotiques (Muylaert et Mainil, 2012)

1.5. Type de mécanismes de résistances :

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens, les plus répandus étant l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule. D'autres mécanismes tels que la protection ou la sur-production de la cible de l'antibiotique sont également décrits. Ils sont, cependant, plus rares et surtout associés à certaines classes de composés (Guardabassi et Courvalin, 2006). La figure 15 présente une illustration de différents mécanismes de résistances aux antibiotiques au sein des bactéries Gram négatives.



1.5.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique :

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, pour la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique (Nikaido, 2009).

1.5.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique :

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible (Muylaert et Mainil, 2012).

1.5.3. Pompes à efflux :

L'efflux actif, médié par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, est un mécanisme nécessitant de l'énergie et utilisé par les bactéries, par les cellules eucaryotes dont notamment les protozoaires, pour expulser à l'extérieur des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que des antibiotiques et d'autres médicaments. Ces pompes à efflux ont généralement une spécificité de substrats assez large, et seulement certaines d'entre elles confèrent une résistance aux antibiotiques. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible. On classe ces pompes à efflux sur base notamment de leur spécificité de substrats et de la source d'énergie employée (Muylaert et Mainil, 2012).

1.5.4. Perméabilité réduite :

Contrairement aux bactéries Gram positives, dont la structure enveloppante est assez simple, composée d'une paroi externe épaisse de peptidoglycanes que les antibiotiques traversent par simple diffusion, les bactéries Gram négatives jouissent quant à elles d'une enveloppe plus complexe et plus difficilement franchissable (Muylaert et Mainil, 2012).

Ainsi, au sein des bactéries Gram négatives, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes

diffusent simplement à travers la couche phospholipidique. La membrane externe de certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* est moins perméable que celle d'autres espèces, ce qui lui confère un niveau moins élevé de sensibilité aux antimicrobiens. En outre, des mutations au niveau des gènes qui codent pour les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques (Muylaert et Mainil, 2012).

1.5.5. Protection de la cible de l'antibiotique :

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ainsi, on ne dénombre pas moins de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome. Depuis quelques années, des souches présentant des résistances sub-cliniques dites à bas niveau aux fluoroquinolones ont été observées. Ces résistances sont notamment dues à la présence de gènes plasmidiques qnr (pour quinolone resistance) dont 5 groupes existent (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2008).

1.5.6. Piégeage de l'antibiotique :

Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible. Ainsi des mutations chromosomiques responsables d'une surproduction des cibles des sulfamidés et dutriméthoprime ont été décrites chez de nombreuses espèces bactériennes. Ce mécanisme est également impliqué dans des bas niveaux de résistance aux glycopeptides chez certaines souches de *Staphylococcus aureus*, et à la tobramycine chez *Escherichia coli* (Guardabassi et Courvalin, 2006).

2. ANTIFONGIQUES :

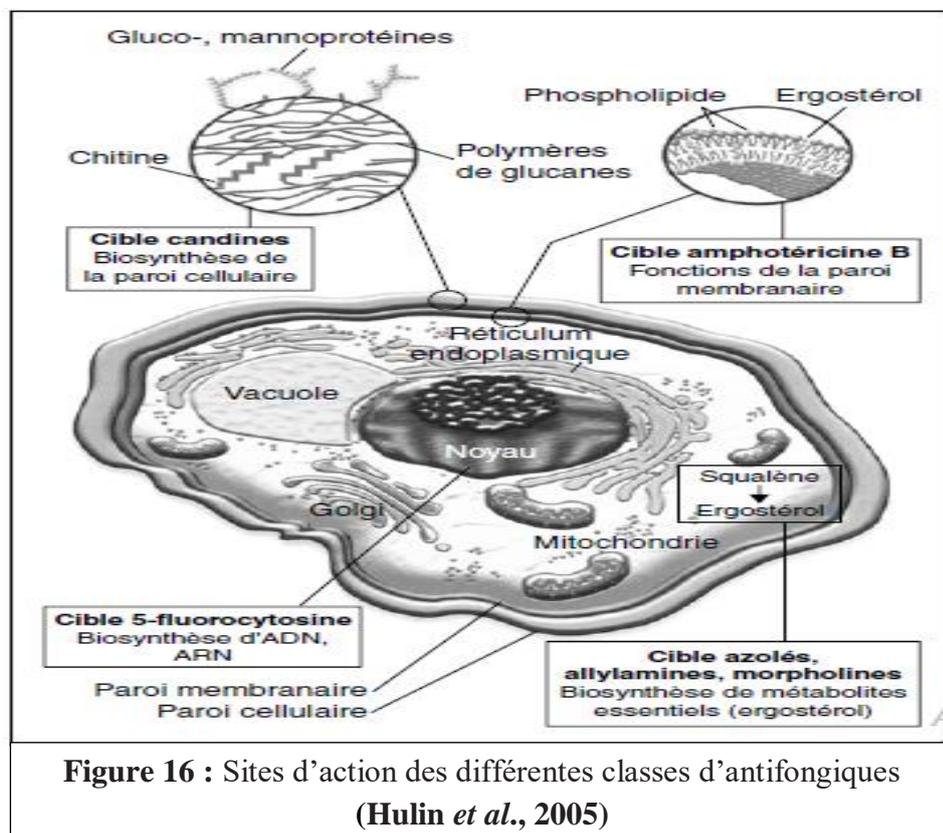
2.1. Définition:

D'après Berdy *et al.* (1987), près de 40% des antibiotiques synthétisés par l'ensemble des microorganismes sont actifs contre les champignons. Plus de la moitié de ces antifongiques sont actifs également contre les bactéries. Selon la nature des molécules qu'ils renferment, nous distinguons deux groupes: les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques de structure non polyénique pouvant être souvent antibactériens également (Badji, 2006).

Les antifongiques représentent désormais une classe thérapeutique en pleine expansion, malgré un surcoût économique important. Les formulations phospholipidiques d'Amphotéricine B, mieux tolérées, permettent une meilleure prise en charge thérapeutique des patients. L'apparition des antifongiques azolés, le fluconazole, l'itraconazole et le voriconazole et depuis peu, de la classe des échinocandines dont la caspofungine est le premier représentant a enrichi l'arsenal thérapeutique. Les azolés représentent à ce jour la classe la plus utilisée dans le traitement des mycoses systémiques (Hulin *et al.*, 2005).

2.2. Classification des agents antifongiques

Sur la base de leurs cibles pour le traitement antifongique les agents antifongiques peuvent être classés dans les groupes suivants (Figure 16):



2.2.1. Inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol :

L'ergostérol est le composant principal de la membrane cellulaire fongique et contribue à diverses fonctions cellulaires telles que la fluidité et l'intégrité de la membrane et le bon fonctionnement des enzymes liées à la membrane (**Campoy et Adrio, 2016**).

2.2.1.1. Azoles :

Les azoles sont de loin les médicaments antifongiques les plus courants en utilisation clinique. Ils sont très utilisés dans le traitement et la prévention des mycoses en raison de leur large spectre d'activité. La conformation exacte du site actif diffère entre les espèces fongiques et parmi les nombreuses mono-oxygénases P450 de mammifères. La nature de l'interaction entre chaque molécule d'azole et chaque type de P450 détermine leurs caractéristiques antifongiques et leurs effets secondaires. Les azoles sont des molécules organiques cycliques qui peuvent être classées en deux groupes: les imidazoles et les triazoles. Cependant, en raison de leur toxicité élevée, de leurs effets secondaires graves et de nombreuses interactions avec d'autres médicaments, ils ont été remplacés par les triazoles (**Campoy et Adrio, 2016**). Les triazoles de première génération (Itraconazole et Fluconazole) présentent un spectre d'activité antifongique plus large que les imidazoles et présentent des profils de sécurité significativement améliorés (**Campoy et Adrio, 2016**).

2.2.1.2. Allylamines :

Ces agents fongicides synthétiques bloquent la biosynthèse de l'ergostérol car ils sont des inhibiteurs réversibles et non compétitifs de la squalène époxydase (ERG1). Cette enzyme catalyse la conversion du squalène en époxyde de 2,3-squalène. L'inhibition de cette activité enzymatique conduit à l'accumulation de squalène qui peut augmenter la perméabilité conduisant à une perturbation de l'organisation cellulaire (**Campoy et Adrio, 2016**). Les membres importants de ce groupe comprennent la terbinafine et la naftifine. Terbinafine a été isolé à partir de cultures de *Streptomyces* sp. KH-F12. Il est actif contre *Aspergillus*, *Fusarium* et autres champignons filamenteux (**Vincent, 2000**).

2.2.1.3. Morpholines :

L'amorolfine est un dérivé synthétique de morpholine soluble dans l'eau qui inhibe deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol, l'isomérase $\Delta^7-\Delta^8$ (ERG2) et la D14-réductase (ERG24). Amorolfine est utilisé dans le traitement topique des infections des ongles et a une activité fongistatique et fongicide in vitro (**Campoy et Adrio, 2016**).

2.2.2. Perturbateurs membranaires fongiques :

Les polyènes sont des molécules organiques macrocycliques appelées macrolides. La plupart d'entre eux consistent en un cycle de macrolactone de carbone 20-40 conjugué avec un groupe d-mycosimine (Mayers, 2009). En raison de leur structure amphiphile, ces molécules se lient à la bicouche lipidique et forment un complexe avec les pores producteurs d'ergostérol. La formation de pores favorise la perturbation de la membrane cellulaire, la fuite du contenu cytoplasmique et les dommages oxydatifs entraînent la mort cellulaire fongique (Andes, 2000). Les polyènes ont été les premiers médicaments antifongiques à usage clinique. Ils sont fongicides et ont le spectre d'activité le plus large par rapport à toutes les autres molécules antifongiques (Campoy et Adrio, 2016).

Ces dernières années, les principaux efforts ont été concentrés sur la recherche de nouvelles molécules qui minimisent la toxicité de ces trois composés (Gibbs, 2005). De nouveaux polyènes semi-synthétiques ont été développés montrant une meilleure solubilité dans l'eau, une hématotoxicité inférieure à celle de l'amphotéricine B, une sélectivité supérieure vis-à-vis des vésicules contenant de l'ergostérol et une activité plus élevée contre les souches de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Candida albicans* résistantes à l'amphotéricine B (Santo, 2010).

2.2.3. Synthèse de la paroi cellulaire fongique :

2.2.3.1. Inhibiteurs de la synthèse du β -glucane :

Actuellement, les seuls antifongiques disponibles ciblant la paroi cellulaire sont trois échinocandines (caspofungine, micafungine et anidulafungine). Les échinocandines sont les agents antifongiques les plus récents bien qu'ils aient été approuvés pour un usage clinique par la FDA et l'EMA (Agence européenne des médicaments) il y a plus de dix ans. Ils agissent en tant qu'inhibiteurs non compétitifs du complexe enzymatique β -(1,3)-D-glucan synthase, ciblant spécifiquement la sous-unité FskI qui entraîne une perturbation de la structure des parois cellulaires en croissance, entraînant une instabilité osmotique et la mort des cellules fongiques (Campoy et Adrio, 2016).

Ces médicaments sont mal absorbés dans le tractus gastro-intestinal en raison de leur poids moléculaire élevé. Les échinocandines présentent de très bons profils de sécurité et leur toxicité est très faible en raison de leur cible unique, qui est absente des cellules de mammifères et les interactions avec d'autres médicaments sont minimales (Petrikos et Skiada, 2007). Cependant, ils ont une demi-vie courte, de sorte qu'ils doivent être administrés une fois par jour par voie intraveineuse, ce qui limite leur utilisation à l'hôpital (Pfaller *et al.*, 2016). Les efforts pour obtenir de nouvelles échinocandines sont pertinents car ces composés présentent une activité antifongique à large spectre et une éventuelle utilisation en association avec des azoles ou de l'amphotéricine B pourrait renforcer

leur action contre les agents pathogènes fongiques sans provoquer le développement de souches résistantes (Pfaller *et al.*, 2016).

2.2.3.2. Inhibiteurs de synthèse de la chitine :

La chitine est un composant mineur de la paroi cellulaire (3%) qui consiste en un homopolymère linéaire de la N-acétylglucosamine liée β -(1,4) liée de manière covalente au β -(1,3)-D-glucane. La synthèse de la chitine est médiée par plusieurs enzymes appelées chitine synthases. La chitine assure l'intégrité structurelle et lorsque sa synthèse est perturbée, la paroi cellulaire devient osmotiquement instable. Parce que la chitine est absente dans les cellules humaines, elle est considérée comme une excellente cible pour les agents antifongiques (Campoy et Adrio, 2016). Les inhibiteurs de chitine synthase les plus étudiés sont les nikkomycines et les polyoxines. Ce sont des antifongiques peptidyl nucléosidiques d'origine naturelle qui se lient au site catalytique en agissant comme analogues compétitifs de l'UDP-Nacétylglucosamine (Castelli *et al.*, 2014). Cependant, leur utilisation clinique actuelle est compromise en raison de leur responsabilité hydrolytique et de leur faible activité *in vivo* (Campoy et Adrio, 2016).

2.2.4. Inhibiteurs de la biosynthèse des sphingolipides :

Les sphingolipides sont des composants abondants des membranes des cellules eucaryotes et, en plus de jouer divers rôles dans les cellules fongiques, certains d'entre eux jouent un rôle important dans la pathogenèse fongique (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016). Récemment, certaines études ont démontré qu'agir sur les enzymes impliquées dans la biosynthèse des sphingolipides pourrait atténuer la virulence des agents pathogènes fongiques. La réaction est une étape clé de la biosynthèse fongique des sphingolipides qui joue un rôle essentiel à la fois en tant que composants structurels de la membrane cellulaire et en tant que signalisation cellulaire. L'IPC synthase n'étant pas présente dans les cellules de mammifères, les inhibiteurs de l'IPC synthase pourraient être de bons candidats pour développer des agents antifongiques (Rollin-Pinheiro *et al.*, 2016). Récemment, de nouveaux dérivés de l'Aureobasidine A ont été synthétisés en modifiant et/ou en échangeant des acides aminés dans sa séquence produisant des composés à forte activité contre *Aspergillus fumigatus* (Wuts *et al.*, 2015).

2.2.5. Inhibiteurs de synthèse des acides nucléiques :

La flucytosine (5-FC; 5-fluorocytosine) est un analogue de la pyrimidine fluorée ayant une activité fongistatique qui interfère avec le métabolisme de la pyrimidine, ainsi que la synthèse de l'ARN/ADN et des protéines (Campoy et Adrio, 2016). Il est absorbé par les cellules fongiques via la cytosine perméase et converti par la cytosine désaminase en 5-fluorouracile (5-FU) qui est

transformé par l'UMP pyrophosphorylase en 5-fluorouridine monophosphate (5-FUMP), qui est phosphorylé et incorporé dans l'ARN, au lieu de l'UTP, ce qui entraîne une inhibition de la synthèse des protéines. La plupart des champignons filamenteux manquent de thymidylate synthase et, par conséquent, le spectre utile de la flucytosine est limité aux levures pathogènes. La résistance est assez souvent vue ainsi 5-FC est habituellement employé comme adjuvant plutôt que sur la thérapie primaire (Campoy et Adrio., 2016).

2.2.6. Inhibiteurs de biosynthèse des protéines :

Tavaborole est un antifongique oxaborole approuvé par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA) en 2014 pour le traitement topique de l'onychomycose de l'ongle causée par *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes*. Il montre des activités antifongiques contre les levures, les moisissures et les dermatophytes (Gupta et Versteeg, 2016). Une enzyme fongique essentielle pour la synthèse des protéines. Tavaborole cible cette enzyme en se liant au site d'édition avec l'ARNt de sorte que cela ne peut pas terminer le transfert d'acides aminés vers le ribosome pour l'assemblage et la synthèse des protéines est efficacement bloquée. Tavaborole a une affinité 1.000 fois plus élevée pour la synthétase fongique que pour l'enzyme humaine (Gupta et Versteeg., 2016). De nouveaux dérivés semi-synthétiques ont également été synthétisés en remplaçant la partie glycosidique par différents groupements comme l'alcanesulfonate, l'alkylthio, le cycle morpholinyle, le cycle oxazépane ou le cycle tétrahydrofurane trisubstitué (Campoy et Adrio., 2016).

2.2.7. Inhibiteurs de la biosynthèse des microtubules :

Les microtubules sont des polymères de dimères de tubuline a et b qui forment un squelette cellulaire hautement organisé dans toutes les cellules eucaryotes (Campoy et Adrio., 2016). Les agents antifongiques comme la griséofulvine ou la vinblastine appartiennent à ce groupe. La griséofulvine est un produit naturel isolé de la *griséofulvine de Penicillium* en 1939 et a été le premier agent inhibiteur des espèces fongiques (Campoy et Adrio., 2016). Il est toxique pour le foie et son spectre d'action est limité aux champignons dermatophytes (causant la teigne et le pied d'athlète). Ce composé se lie à la tubuline, interférant avec l'assemblage des microtubules fongiques et inhibant la mitose (Campoy et Adrio., 2016).

2.3. Résistances des champignons aux antifongiques :

Le développement de la résistance aux antifongiques est associé à l'emploi abusif d'agents antimicrobiens en médecine humaine, en zootechnie, en agriculture, en aquaculture et en industrie agro-alimentaire (**Balkis et al., 2002**). Ce phénomène est devenu fréquent après 1970 et ce, suite à l'utilisation continue et à grande échelle d'antifongiques systémiques unisites. En agriculture, l'utilisation de fongicides tels que le bénomyl, le thiophanate-méthyle, le métalaxyl et d'autres, a provoqué l'apparition de nombreuses souches résistantes appartenant aux genres *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Sphaerotheca*, *Ustilago*, etc. (**Venkateswarlu et al., 1995**). La résistance aux fongicides de type benzimidazole est sérieuse car les souches résistantes de champignons, tel *Botrytis*, ont souvent la même virulence et la même compétitivité que les souches sensibles. Au niveau hospitalier, un nombre important de souches fongiques devient résistant à ces produits, posant ainsi un véritable problème de santé publique (**Leroux, 1987**).

3. Biosynthèse des antibiotiques:

Les métabolites secondaires sont généralement formés lorsque le taux de croissance des microorganismes atteint une valeur seuil, le plus souvent faible (**Bu'Lock, 1975**). En culture continue, la synthèse d'un antibiotique est optimale si le taux de croissance est maintenu entre 50 et 80% du taux de croissance maximal de la cellule (**Gray et Bhupathapun, 1980**). Il est toutefois difficile de déterminer le rôle du taux de croissance per se dans l'initiation du métabolisme secondaire car il n'est pas indépendant du phénomène de limitation nutritionnelle.

Les productions de céphamycine C et de thiénamycine chez *Streptomyces cattleya* sont soumises à deux types de régulation: un faible taux de croissance est l'une des conditions pour la synthèse de la céphamycine indépendamment de la nature du substrat limitant. Par contre, une limitation nutritionnelle spécifique par le phosphate, associée à un faible taux de croissance, est nécessaire pour la production de la thiénamycine (**Lilley et al., 1981**). De même, le contrôle de la biosynthèse de l'actinorhodine relèverait d'un processus multifonctionnel mettant en jeu, selon les conditions de culture de *Streptomyces coelicolor*, soit le taux de croissance du microorganisme, soit les concentrations en phosphate et en azote du milieu (**Doull et Vining, 1990**).

4. Facteurs influençant la production d'antibiotiques :

La production des antibiotiques (métabolites secondaires) chez les actinobactéries dépend de l'activité enzymatique relative à la voie métabolique concernée et de la quantité de précurseurs disponibles. Ces deux paramètres sont sous l'influence de plusieurs facteurs nutritionnels (sources de

carbone et d'azote, de phosphate inorganique, d'oligoéléments, etc.) et physico-chimiques et environnementaux (pH, température, aération et vitesse d'agitation) (Augustine *et al.*, 2005).

4.1. Facteurs nutritionnels

La production d'antibiotiques dépend de la nature et de la concentration des composés nutritifs. En effet, plusieurs travaux ont montré que la nature des sources de carbone et d'azote, de phosphore, de potassium et d'éléments minéraux influence considérablement la production des antibiotiques (Mellouli *et al.*, 2003). De plus, l'origine d'une même source de carbone peut parfois affecter la production d'antibiotiques (Adinarayana *et al.*, 2003). Beaucoup d'autres composés et ions tels que le sulfate, le chlorure, l'acétate et l'arginine peuvent influencer la production de certains antibiotiques (Gesheva *et al.*, 2005). Par ailleurs, la production d'antibiotiques peut parfois être sous l'influence de certaines substances comme le glucose, les phosphates et les ions ammonium qui peuvent ainsi exercer un effet répressif en relation avec la concentration utilisée et avec l'antibiotique produit (Sujatha *et al.*, 2005). Des manipulations génétiques des souches ont aussi permis l'amélioration de la production d'antibiotiques. C'est le cas de la production de la pénicilline par les souches originales qui est passée sous forme de traces (1 à 20 mg/L) jusqu'à plus de 40 g/L (Anne *et al.*, 1989).

4.2. Facteurs physico-chimiques et environnementaux

L'influence du pH sur la production des antibiotiques a été démontrée. Par exemple, chez *Streptomyces rochei* AK39, la production d'un antifongique est soit stimulée ou inhibée en fonction des variations du pH (Augustine *et al.*, 2005). A propos de la température, une étude réalisée par Sujatha *et al.* (2005) a montré qu'une souche de *Streptomyces* pouvait croître entre 20°C et 40°C, mais produisait l'antibiotique polykétide SBR-22 uniquement entre 25°C et 33°C avec un optimum de production à 30°C. Concernant, l'agitation, celle-ci affecte non seulement l'aération mais aussi le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de culture, ce qui affecte par conséquent la production d'antibiotiques. Ainsi, il a été rapporté que pour une souche de *Streptomyces*, la meilleure production d'antibiotiques est obtenue à une agitation comprise entre 200 et 250 rpm (Mellouli *et al.*, 2004).

Chapitre III :

Isolement, Sélection et Identification des Actinobactéries

1. Collecte des échantillons :

Les actinobactéries se présentent sous forme de saprophytes dans divers habitats naturels, y compris le sol, les lacs, les océans, les plantes et les animaux. Le sol reste une source fructueuse de nouvelles actinobactéries. Les nombres et les types d'actinobactéries présents dans le sol et d'autres substrats sont grandement influencés par des facteurs écologiques primaires, tels que les nutriments, l'aération, le pH, la température, la salinité, l'humidité et la teneur en matière organique. En effet, le succès de l'isolement d'un grand nombre d'actinobactéries spécifiques peut dépendre fortement du choix des échantillons environnementaux (Jiang *et al.*, 2016).

1.1. À partir de l'eau :

L'eau est le seul composé présent, à l'état naturel, sous ces trois phases : liquide, solide et gazeuse. L'eau est partout et constitue la base de la vie. En effet, les premières formes de vie se sont développées dans les océans et, encore aujourd'hui, plus de la moitié des espèces animales et végétales vivent dans l'eau. La présence de bactéries dans l'eau est un phénomène normal et constitue un aspect primordial de la décomposition de la matière organique et du recyclage des éléments nutritifs essentiels au maintien des organismes aquatiques et de la chaîne trophique (Hébert et Légaré, 2000).

Le prélèvement des échantillons d'eau peut s'effectuer de plusieurs façons, selon la taille du cours d'eau et l'accessibilité au site. Dans les ruisseaux et rivières de faible profondeur, l'idéal est de se placer au centre du cours d'eau et de remplir les bouteilles à la main, au milieu de la colonne d'eau, en faisant face au courant (Figure 17). Lorsque la profondeur ou le débit élevé empêche le prélèvement à la main, l'utilisation d'un pont est la façon la plus facile d'avoir accès au centre du cours d'eau (Hébert et Légaré, 2000). La Direction du suivi de l'état de l'environnement utilise un système de porte bouteille (échantillonneur) installé sur un socle lesté de plomb qui permet de prélever, même à de forts débits, des échantillons à partir des ponts (Figure 18).

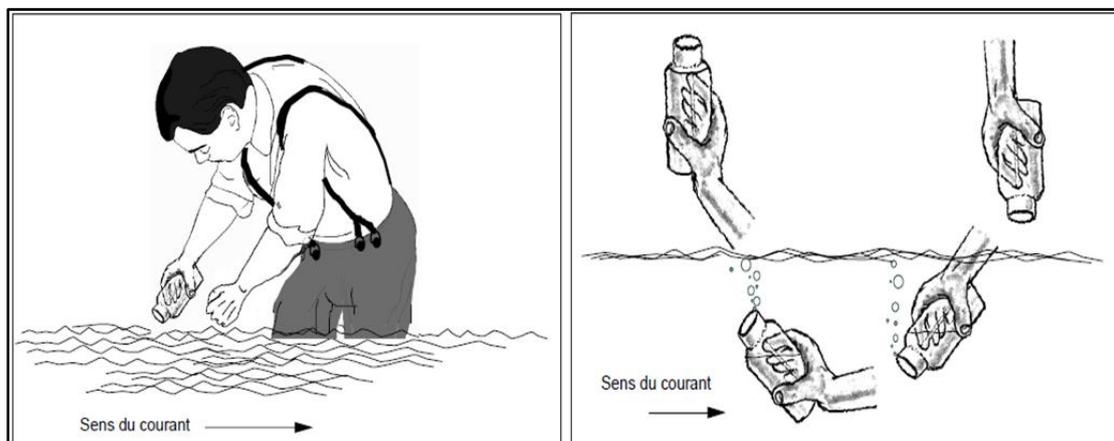


Figure 17 : Échantillonnage d'un cours d'eau à gué

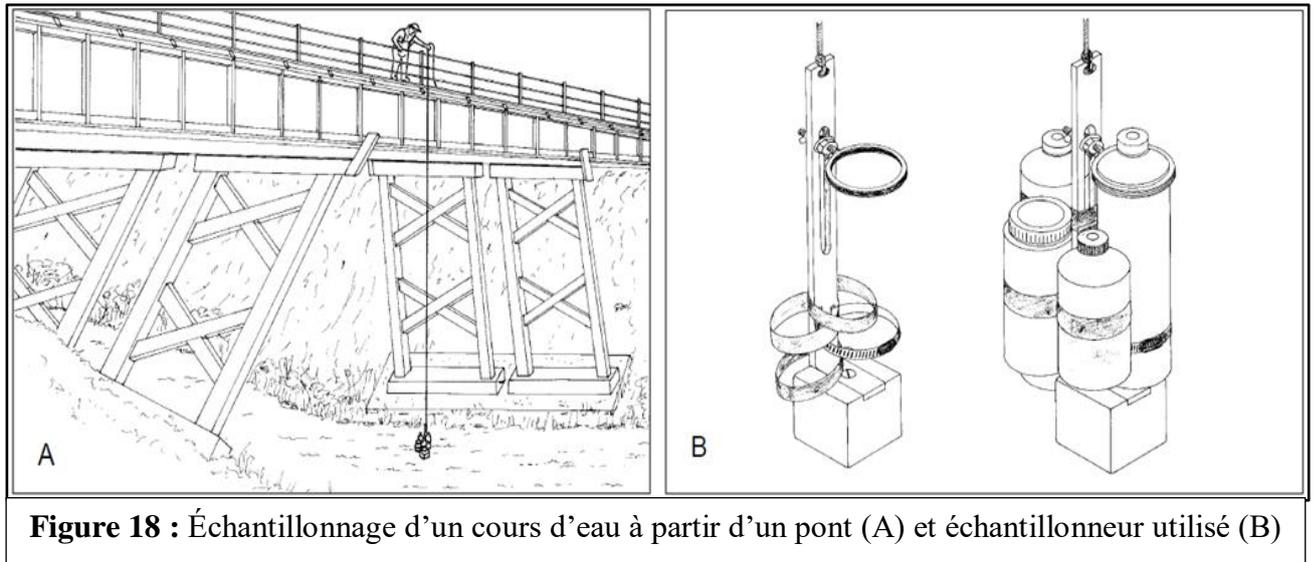


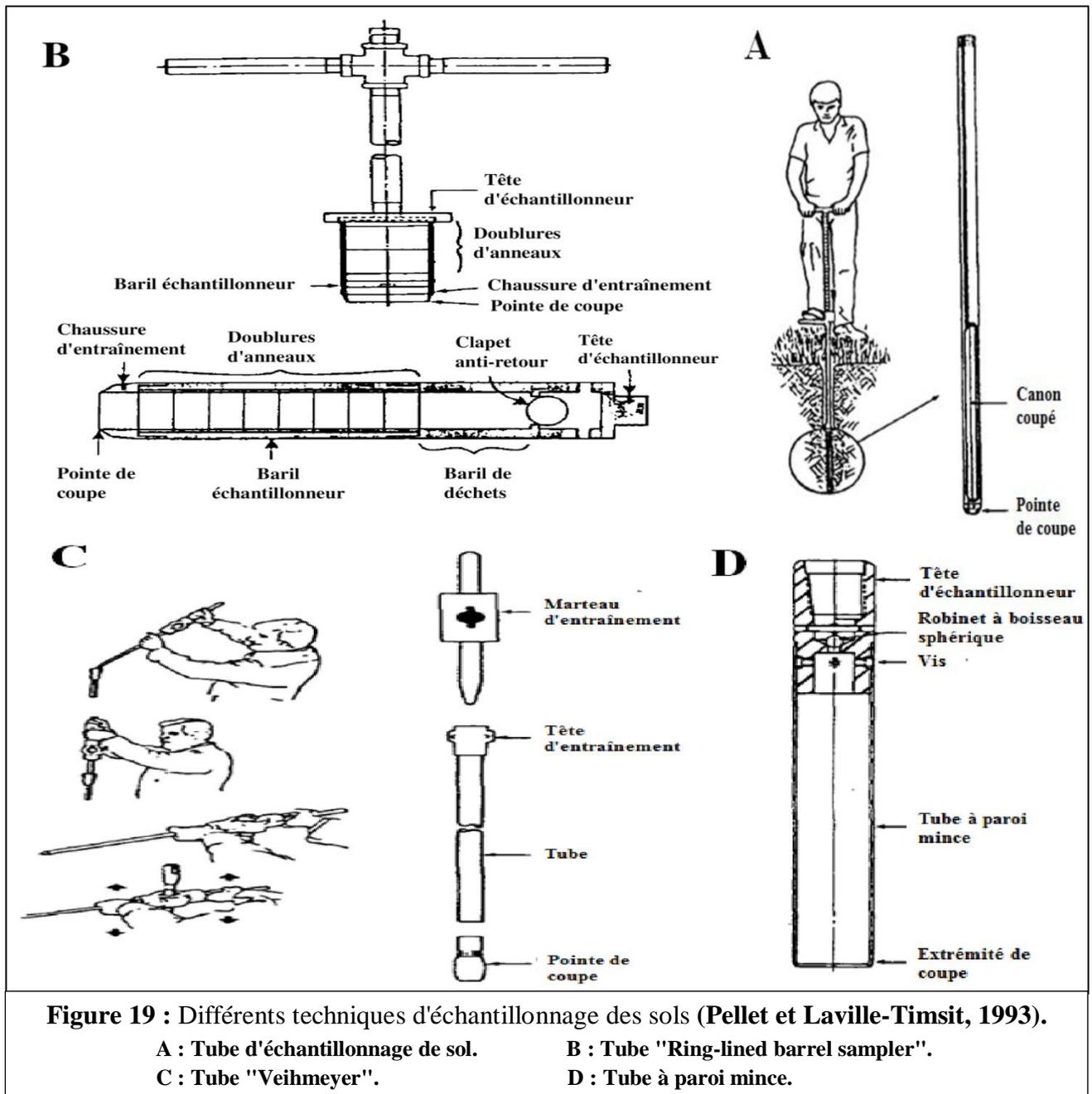
Figure 18 : Échantillonnage d'un cours d'eau à partir d'un pont (A) et échantillonneur utilisé (B)

Afin de préserver l'intégrité des échantillons prélevés entre le moment de l'échantillonnage et celui de l'analyse en laboratoire, une étape de conservation est nécessaire puisque plusieurs paramètres peuvent subir des modifications physiques ou des réactions chimiques dans le récipient, ce qui altère la qualité originale de l'échantillon. Il est recommandé de conserver les échantillons à l'obscurité et à une température de 4 °C dans une glacière contenant de la glace. Cette méthode est couramment utilisée lorsque les analyses sont effectuées dans les 24 heures suivant l'échantillonnage. (Hébert et Légaré, 2000).

1.2. À partir du sol :

L'échantillonnage des sols constitue une partie importante d'une étude de caractérisation d'un terrain et fait aussi partie intégrante des travaux de restauration. L'échantillonnage du sol doit tenir compte des différentes particularités qui lui sont associées. En effet, le sol se distingue des autres milieux (eau, air) par son degré d'hétérogénéité de constitution et de distribution et par ses caractéristiques. Étant donné les différents modes de déposition géologique, la nature et la composition du sol peuvent varier rapidement sur de courtes distances, aussi bien dans le plan horizontal que vertical. Également, les sols de surface sont souvent remaniés par l'action de l'homme (MDDEPQ, 2008).

Techniques où l'échantillonnage est provoqué par poussée d'un tube (ou d'une sonde) dans le sol, entraînant ainsi son remplissage sur toute la hauteur pénétrée. Selon les procédés, le diamètre du tube est variable (autour de 50 mm), et la poussée peut être d'origine mécanique, hydraulique, ou manuelle (Pellet et Laville-Timsit, 1993). Figure 19 représente différents procédés de ce type sont proposés :



Il est préférable de collecter les échantillons de sol de la zone vierge, y compris la forêt vierge, les sols salins, les sols alcalins et le désert. Des échantillons de sol d'une profondeur de 5 à 20 cm sont collectés et placés dans un récipient stérile (Jiang *et al.*, 2016). Plusieurs conditions doivent être remplies pour obtenir un échantillon et à partir de celui-ci des indicateurs optimaux pour l'échantillonnage du sol :

- La collecte d'échantillons nécessite une bonne connaissance des outils et la sélection des matériaux utilisés est importante pour atteindre les objectifs souhaités (Pellet et Laville-Timsit, 1993) ;

- En général, la couche superficielle humique et la plus active est échantillonnée dans le profil du sol à une profondeur d'environ 5 à 10 cm (**Pellet et Laville-Timsit, 1993**) ;
- Étudier la microflore du sous-sol, nous ajusterons la profondeur de l'échantillon à environ 30-40 cm ou à un niveau inférieur. Évidemment, nous ne mélangerons pas d'échantillons de différentes couches (**Simonart, 1975**) ;
- Le point difficile est le nombre d'échantillons, que nous devons prélever afin d'obtenir une image représentative de l'état microbiologique, qui prévaut dans le domaine de la microbiologie étudiée indique la collecte de 3 ou 4, 8 échantillons moyens par hectare (**Pellet et Laville-Timsit, 1993**) ;
- Le sol doit être collecté et conservé sans séchage pour éviter tout changement du côté microbiologique de l'échantillon (**MDDEPQ, 2008**)

Pour évaluer l'état actuel et les possibilités d'activité microbienne d'un sol, il faut procéder aux analyses immédiatement après le prélèvement des échantillons (pas plus tard qu'après 24 heures de conservation), ou bien il ne faut commencer l'analyse qu'après l'établissement de l'équilibre microbiologique dans ce sol, donc après 2 à 4 semaines de sa conservation à température de 10-15 °C (**Simonart, 1975**).

2. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons :

2.1. Propriété physicochimique de l'eau :

✓ pH

Le pH de l'eau mesure la concentration des protons H^+ contenus dans l'eau. Ce paramètre détermine l'équilibre physico-chimique entre l'eau, le gaz carbonique dissous, les carbonates et les bicarbonates qui forment des solutions tamponnées conférant à la vie aquatique un développement favorable. La mesure se fait directement à l'aide d'un pH -mètre (**Belghiti et al., 2013**).

✓ Conductivité électrique

La conductivité électrique (CE) représente la capacité de l'eau à conduire un courant électrique. Elle est proportionnelle à la minéralisation de l'eau, ainsi plus l'eau est riche en sels minéraux ionisés, plus la conductivité est élevée (**Reggam et al., 2015**). Elle représente également la conductance d'une colonne d'eau comprise entre deux électrodes métalliques (Platine) de 1 cm² de surface et séparée l'une de l'autre de 1 cm. Elle est l'inverse de la résistivité électrique (**Belghiti et al., 2013**).

2.2. Propriétés physico-chimiques du sol :

Les caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés ont été déterminées à l'aide des techniques suivantes :

- ❖ Le pH d'une suspension diluée de 10 g de sol et 25 ml d'eau distillée a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre à électrode en verre à température ambiante avec agitation magnétique (**Boudoudou et al., 2009**).
- ❖ Matière organique quantifiée par la méthode de Lee et Hwang (2002), l'échantillon est incinéré pendant 16 heures dans un four à moufle à 450 °C. La matière organique est représentée par la différence entre le poids sec et le poids des cendres (**Djaballah, 2010**).
- ❖ Le phosphore assimilable est déterminé selon la méthode d'Olsen *et al.* (1954): l'extraction des formes de phosphore solubles se fait grâce à la formation d'acide carbonique par dissolution de bicarbonate de sodium (**Olsen et al., 1954**).
- ❖ Humidité Déterminée par la différence des pesées du sol séché à l'air ambiant et chauffé à 105 °C (**Touhtouh et al., 2014**).
- ❖ La conductivité électrique donne une indication sur la teneur en électrolytes hydrosolubles (salinité) et a été mesurée sur un extrait aqueux de sol (1/5 p/v) moyennant un conductimètre à électrode (**Boudoudou et al., 2009**).

N.B : L'analyse physico-chimique des échantillons destinés à l'étude microbiologique vise à ajuster les milieux d'isolation utilisés aux conditions environnementales d'origine, ce qui est nécessaire pour garantir l'obtention de résultats représentatifs (**Boudoudou et al., 2009**).

3. Prétraitement des échantillons :

Le prétraitement du sol peut stimuler l'isolement des actinobactéries en favorisant la croissance des actinomycètes ou en éliminant la plupart des bactéries gram négatives indésirables (**Kumar et Jadeja, 2016**). Diverses techniques de prétraitement ont été développées pour différents genres d'actinobactéries. Dans les habitats naturels, les streptomycètes sont communs et constituent généralement une composante majeure de la population totale d'actinomycètes (**Hayakawa, 2008**).

Les streptomycètes peuvent être facilement isolés par des méthodes de prétraitement physique, mais pour isoler d'autres que les streptomycètes, des méthodes chimiques ou des combinaisons de méthodes physiques et chimiques sont utilisées (**Kumar et Jadeja, 2016**).

3.1. Traitement physique :

Les traitements physiques tels que l'incubation humide par rayonnement, le traitement au glycérol, le séchage à l'air, la chaleur sèche, la centrifugation, l'infiltration de cellulose, la technique d'appâtage suivie d'un séchage sont couramment utilisés pour différents genres d'actinobactéries. Parmi ces techniques :

- ✓ Le séchage de l'échantillon à une température de 120°C aide à se débarrasser des bactéries à Gram négatif et permet la croissance des actinobactéries (Tamura *et al.*, 1997).
- ✓ La combustion du sol favorise également la croissance des actinobactéries et élimine de l'échantillon les bactéries et les champignons à une température de 110 ° C (Chandwad et Sudhakar, 2019).
- ✓ La centrifugation aide à isoler les actinobactéries mobiles de l'échantillon dans le surnageant et à laisser les actinobactéries non mobiles en bas (Hayakawa, 2008).
- ✓ l'isolement sélectif des actinobactéries filamenteux à partir de populations microbiennes mixtes sans recourir à des milieux spécifiques et à des antibiotiques, une technique d'appâtage membranaire peut être utilisé (Chandwad et Sudhakar, 2019).

L'isolement sélectif des actinobactéries a également été favorisé par le rayonnement (Bredholdt *et al.*, 2007). L'irradiation à très haute fréquence favorise l'isolement des espèces de *Streptosporangium* et de *Rhodococcus*, l'irradiation à très haute fréquence a été efficace pour *Streptosporangium spp*, *Nocardiopsis*, *Nocardia* et l'irradiation UV conviennent à l'isolement des *Nocardiopsis* et des *Pseudonocardias spp* (Kumar et Jadeja, 2016). Un traitement chauffé par le sol séché à l'air ou par des suspensions de sol chauffées peut être utilisé pour isoler sélectivement des taxons spéciaux d'actinobactéries (Tableau 5) (Jiang *et al.*, 2016)..

Tableau 5 : Prétraitements thermiques sélectifs pour l'isolement des actinobactéries (Jiang *et al.*, 2016).

Prétraitement	Cible
Sol séché à l'air chauffé à 120°C pendant une heure	<i>Microbispora.</i> <i>Streptosporangium.</i>
Sol séché à l'air chauffé à 100°C pendant 15 min.	<i>Actinomadura spp.</i>
Suspensions d'eau ou de sol chauffées à 45°C ou 50°C pendant 10 min	<i>Streptomyces spp.</i>
Suspensions d'eau ou de sol chauffées à 60°C pendant 30 min	<i>Micromonospora spp.</i>
Sol séché à l'air chauffé à 120°C pendant une heure	<i>Dactylosporangium</i> <i>Streptosporangium spp.</i>
Sol séché à l'air chauffé à 28°C pendant une semaine	<i>Herbidospora cretea</i>
Suspension de sol chauffée à 110°C pendant une heure	<i>Microtetraspora glauca</i>

3.2. Traitements chimiques :

L'utilisation de traitements chimiques tels que le traitement au carbonate de calcium et à la chitine, le chlorure de calcium, le phénol, le sodium dodecyl sulfate (SDS), l'extrait de levure, le germicide, les agents chimiotactiques et la Chloramine-T peut être utilisée pour l'isolement sélectif

des actinobactéries Le carbonate de calcium et la chitine agissent comme source de carbone et d'azote, soutiennent la croissance des actinobactéries (**Rajan et al., 2016**).

On a signalé un développement sélectif accru des actinobactéries lorsque le sol séché à l'air a été humidifié, mélangé à du carbonate de calcium et incubé à une température de 28°C. A constaté que le traitement au carbonate de calcium donnait le plus grand nombre de colonies, tandis que les traitements par centrifugation et par phénol donnaient des nombres inférieurs à ceux des suspensions non traitées. Le traitement des suspensions de sol avec une solution de phénol à 1,4 % (p/v) a été recommandé par Lawrence (1956). L'échantillon de sol traité au ChloramineT favorise la croissance de certaines espèces sur de l'acide nalidixique contenant de la gélose HV (**Hayakawa, 2008**).

L'échantillon de sol traité avec une sodium dodecyl sulfate (SDS) à 0,05% et un extrait de levure à 5% favorise la croissance de Streptomycètes et d'autres genres sur de l'acide nalidixique contenant de la gélose HV (**Hayakawa, 2008**). Un traitement avec ces agents pendant 30 min à 30°C peut tuer les cellules Gram négatives des bacilles et pseudomonades aérobies endosporeformants, augmenter la fréquence des actinobactéries et réduire les bactéries (Tableau 6).

Tableau 6: Prétraitement chimique pour l'isolement des actinobactéries (**Jiang et al., 2016**).

Prétraitement	UFC (×105/g)			
	Actinobactéries		Bactéries	
Control	117	100%	152	100%
YE, 2%	192	164%	169	110%
HA, 2%	183	156%	92	60%
CA, 1%	170	145%	165	109%
VA, 0.2%	159	136%	178	117%
ME, 0.2%	163	139%	136	87%
SDS, 0.05%	152	157%	10	7%
SDS + YE, 6%	183	157%	22	14%
SDS + HA, 1%	173	148%	9	5%
SDS + CA, 1.5%	153	131%	15	9%
SDS + VA, 0.6%	147	126%	19	12%
SDS + ME, 0.2%	158	135%	14	8%

YE = yeast extract / HA = humic acid / CA = acasein hydrolysate / VA = valine
 SDS = sodium dodecyl sulfate / ME = mercaptoethanol.

3.3. Traitement physique et chimique :

Une combinaison de traitements physiques et chimiques s'est avérée être une méthode plus appropriée pour isoler efficacement divers genres d'actinobactéries. La chaleur sèche de l'échantillon de sol à 110°C pendant 1 heure et le traitement avec 1% de phénol favorisent l'isolement

d'*Actinomadura viridis* sur gélose HV contenant de la kanamycine, de la josamycine, du lysozyme et de l'acide nalidixique. La chaleur sèche de l'échantillon de sol à 120°C pendant 1 heure et 1,5% de phénol favorise la *Microbispora* sur l'acide nalidixique contenu dans la gélose HV. La chaleur sèche à 120°C de l'échantillon de sol avec 0,01% de chlorure de benzéthonium favorise les genres de *Streptosporange* ou de *Dectylosporange* sur l'acide nalidixique et la leucomycine contenue dans la gélose HV (Hayakawa, 2008). Le traitement thermique à sec d'un échantillon de sol à 110°C pendant 1 heure avec du chlorure de benzéthonium à 0,05% soutient *Microtétraspore* sur la kanamycine, l'acide nalidixique et la norfloxacine contenue dans la gélose LSV-SE (Hayakawa et al., 1996b). La méthode du gradient de saccharose suivie d'une gélose HV enrichie en acide nalidixique favorise la croissance de *Nocardia* (Yamamura et al., 2003).

Les suspensions d'échantillons peuvent être traitées avec des ondes ultrasonores à 180 W pendant 40s. Il peut libérer les saprophytes fixés par les granules de sol dans la suspension, augmenter le compte d'actinobactéries et réduire les bactéries dans l'échantillon (Cao, 2010) (Figure 20).

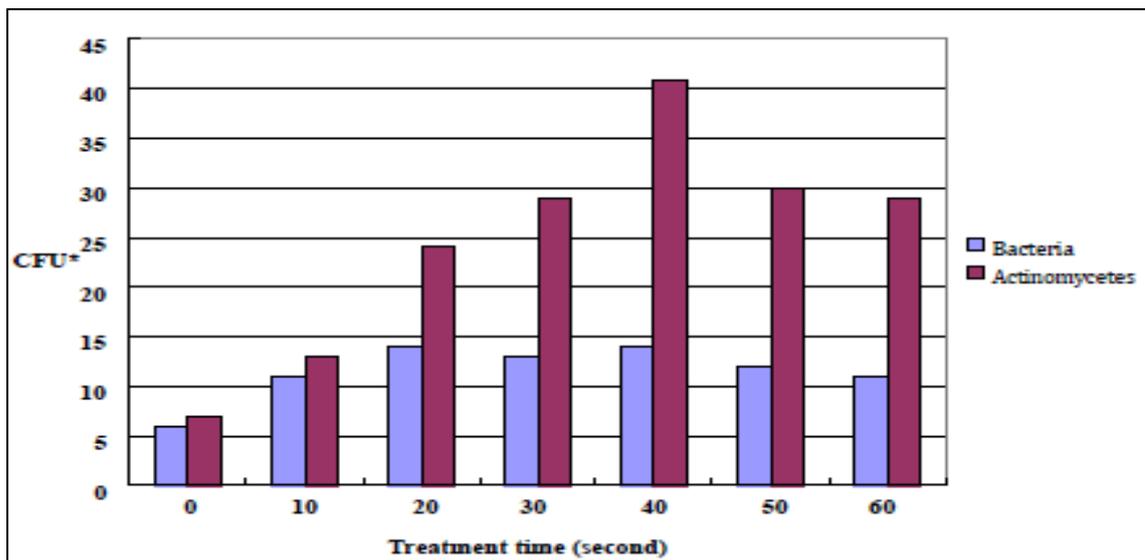


Figure 20 : Influence du traitement par ondes ultrasonores à l'UFC entre les actinobactéries et d'autres bactéries (Cao, 2010)
-UFC: Unité Formant Colonie

4. Isolement des actinobactéries :

En général, l'isolement des actinobactéries a trois objectifs.

Premièrement, l'étude de la communauté des actinobactéries dans un environnement spécial. Dans cette condition, tous les actinobactéries doivent être isolés et identifiés. Pour atteindre cet objectif, les milieux d'isolement utilisés doivent être plus propices à la croissance d' actinobactéries que d'autres microbes. Trois à cinq milieux avec des composants différents doivent être utilisés. Les inhibiteurs contre les champignons et les bactéries Gram négatifs peuvent être ajouté dans les milieux d'isolement (**Jiang *et al.*, 2016**).

Deuxièmement, l'isolement des actinobactéries spéciaux, par exemple une espèce ou un genre connu, ou une sorte d' actinobactéries avec des caractéristiques physiologiques spéciales, à savoir : la résistance aux antibiotiques, aux produits chimiques, aux alcalins, aux acides, aux sels et la croissance aux températures élevées et basses. Les médias d'isolement doivent répondre aux exigences des actinobactéries cibles et inhiber la croissance des micro-organismes indésirables. Par exemple, afin d'isoler les actinobactéries halophiles et alcalophiles extrêmes la concentration en sel des milieux d'isolement doit être de 15 à 25 % et le pH doit être ajusté de 10 à 12 (**Jiang *et al.*, 2016**).

Troisièmement, l'isolement des actinobactéries inconnus. Jusqu'à présent, d'innombrables actinobactéries ont été isolés et identifiés dans divers habitats du monde entier. Elle nécessite l'inhibition de la croissance non seulement des bactéries à Gram-négatif, de certaines bactéries à Gram-positif et des champignons, mais la plupart des actinobactéries courants. Afin d'isoler plus d'actinomycètes inconnus, les chercheurs doivent être familiers avec toutes les connaissances sur la physiologie et la taxonomie des actinobactéries et autres microbes et le rôle de chaque facteur d'isolement (y compris les composants et la concentration des milieux, le pH, les inhibiteurs, les températures de croissance, etc.), et ils devraient avoir une expérience riche. La méthode d'isolement des actinobactéries est un chemin sans fin (**Jiang *et al.*, 2016**).

4.1- Préparation des suspensions-dilutions :

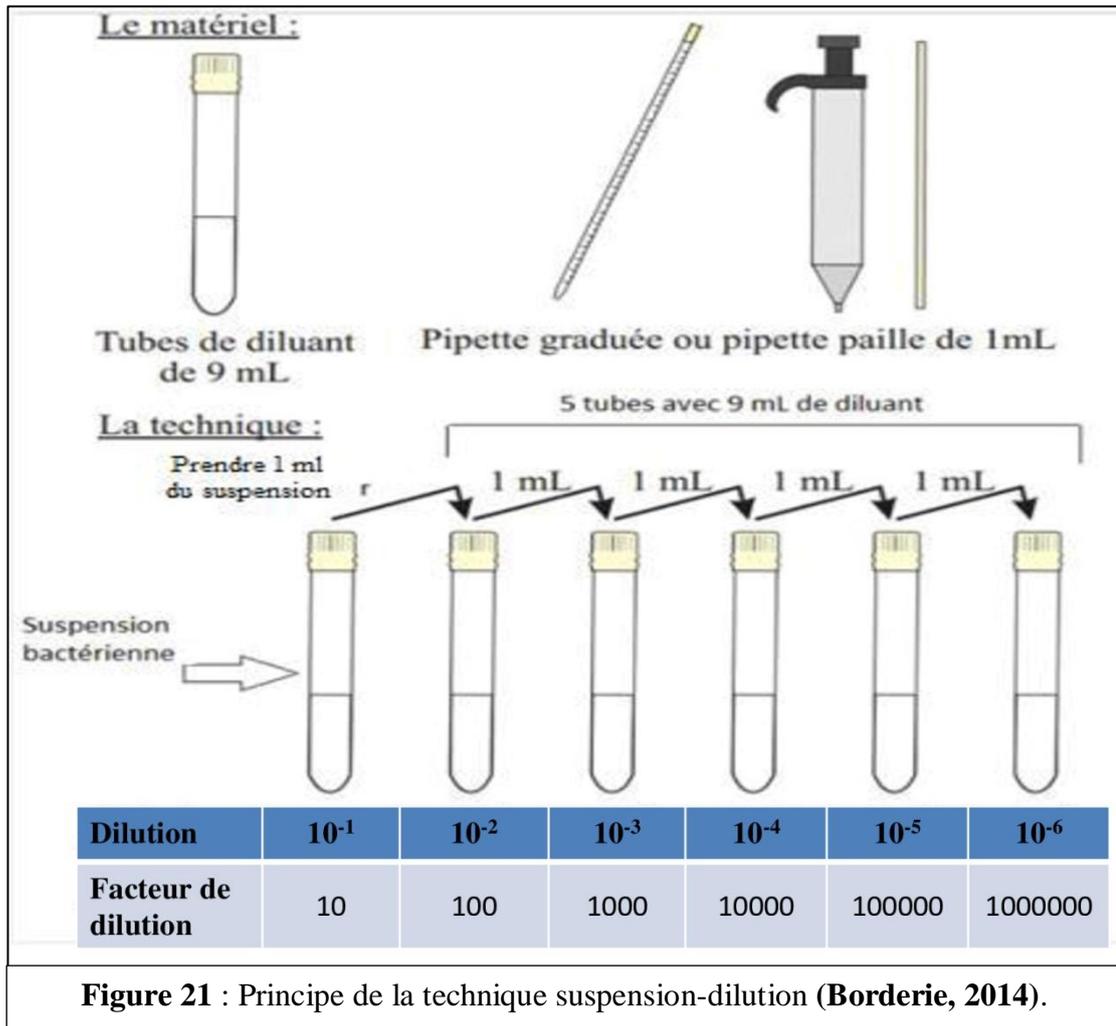
4.1.1- Préparation de suspensions :

Préparer une suspension pour un échantillon de sol. Nous prenons 10g du sol et l'ajoutons dans 100 ml d'eau stérile et mélangé sur agitateur réciproque pendant 30 min et pour l'eau nous prélevons directement la quantité nécessaire pour faire les tests de laboratoire de l'échantillon (**Williams et Davies, 1964**).

4.1.2- Préparation de dilutions :

Le principe est de remettre en suspension la culture d'échantillon étudiée dans un volume connu (10 ml d'eau physiologique), et ensuite de procéder à une série de dilution (par entraînement) qui

permet d'obtenir des concentrations décroissantes en germes (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ...) (Borderie, 2014). Le principe de la méthode est schématisé dans la Figure 21.



4.2. Méthodes d'isolement des actinobactéries sur le milieu de culture :

De nombreux milieux ont été décrits pour isoler les actinobactéries du sol et d'autres matériaux naturels. Certains de ces milieux d'isolement sont plutôt maigres car les actinobactéries ont la capacité de survivre et de se développer dans une certaine mesure sur de très petites quantités de nutriments qu'ils récupèrent des substances non nutritives telles que la gélose purifiée. D'autres milieux d'isolement ont des rapports carbone / azote élevés et contiennent des sources de carbone et d'azote complexes et résistantes, par exemple de l'amidon, de la caséine, de la chitine, de l'acide humique. L'utilisation de ces milieux réduit considérablement le nombre de bactéries présentes sur les plaques d'isolement, car les bactéries, contrairement aux actinobactéries, se développent mieux sur des milieux à faible rapport carbone / azote et sont généralement incapables d'attaquer les polymères résistants de poids moléculaire élevé (Gray et Williams, 1971). Plusieurs des milieux

d'isolement les plus utiles sont énumérés ci-dessous. Cycloheximide (50 µg / ml) et la nystatine 150 µg/ml) devraient être ajoutés à tous ces milieux pour empêcher la croissance des champignons (Corke et Chase, 1956; Williams et Davies, 1965).

4.2.1. Choix du milieu de culture par différents habitats et taux d'incubation :

La conception des milieux d'isolement sélectif doit colliger chaque facteur, tels que les objectifs d'isolement, les taxons cibles d'actinobactéries, le composant du milieu et les inhibiteurs. Le composant (sources de carbone et d'azote) des milieux d'isolement sélectif peut être formulé en utilisant des informations provenant de bases de données taxonomiques et de bases de données phénotypiques (Tableau 7). Les inhibiteurs appropriés doivent être sélectionnés en fonction de la capacité des spores d'actinobactéries cibles à résister aux antibiotiques et aux produits chimiques (Jiang *et al.*, 2016).

Tableau 7 : Milieu d'isolement des actinobactéries et incubation selon l'habitat (Jiang *et al.*, 2016).

Actinobactéries	Milieu d'isolement	N.B	Incubation	
Thermophile	- Milieu Czapek amélioré.	ajouté dans les milieux :	7J à 55°C	
	- Milieu d'asparagine de glycérol.			-5 mg dichromate de potassium
	- Milieu farine d'avoine.			-1 mg de pénicilline
Halophile et Alcalophile	- Arch – caséine milieu.	-Mélanges de sel (pour 1 L)		
	- Milieu d'asparagine de glycérol.		20-35J à 37°C	
	- Milieu extraits de sol.			
	- Milieu T3.			
	- Milieu Horikoshi			
Endophyte (plante)	- Milieu d'extrait de levure d'eau	Dans chaque milieu étaient fournis:	28 ° C pendant 2 à 4 semaines.	
	- Milieu de propionate de sodium			-(50-100) mg de cycloheximide
	- Milieu HV			-100 mg de nystatine
				-25 mg d'acide nalidixique.
		-5 mg de pénicilline pour 1L.		

Note :

- Compositions des milieux d'isolement dans l'annexe 1
- J : jours / L : litre / HV : Humic acid-vitamin

4.2.2. Méthode d'Enrichissement :

Divers genres d'actinobactéries peuvent être isolés par addition d'ingrédients nutritionnels ou non nutritionnels dans des milieux à des fins d'isolement sélectif. L'enrichissement est l'une des méthodes réussies en termes de diversité et d'abondance d'une culture bactérienne. Le prétraitement de la suspension de sol avec de la peptone (6%) et du laurylsulfate (0,05%) à 50°C pendant 10 min a également considérablement augmenté le nombre d'actinobactéries du sol avant l'incubation avec un nouveau milieu. Antonie Van Leeuwenhoek a utilisé la centrifugation différentielle en 2000 pour l'isolement sélectif des actinomycètes mobiles dans le sol et la source végétale. La méthode de réhydratation et de centrifugation (RC) a été développée par Hayakawa et al. pour l'isolement sélectif de genres d'actinobactéries zoosporiques/mobiles divers et rares (Shivabai *et al.*, 2019).

4.2.3. Méthodes de Sélection des actinobactéries :

4.2.3.1. Antibiotiques sélectifs

L'utilisation d'antibiotiques pour sélectionner pour ou contre les microorganismes souhaités est devenue l'une des techniques sélectives les plus importantes pour l'isolement de différents genres d'actinobactéries. Les antibiotiques antifongiques cycloheximide et nystatine cail doivent être systématiquement incorporés dans la gélose d'isolement des actinobactéries à environ 50 µg/ml chacun, respectivement, pour éliminer toute colonie fongique des plaques de dilution du sol (Labeda, 1990). La liste des amendements antibiotiques possibles pour la sélection de différents genres d'actinomycètes continue de s'allonger. Un résumé des combinaisons d'antibiotiques typiques utilisées pour l'isolement sélectif de divers genres est présenté dans le tableau 8 (Labeda, 1990).

4.2.3.2. Sélection nutritionnelle

Les résultats d'une étude taxonomique numérique complète du genre *Streptomyces* ont été appliqués au développement de milieux sélectifs pour l'isolement de membres de différents groupes de grappes phénotypiques de ce genre par Wellington 1987. Les souches identifiées comme membres du groupe "*Streptomyces uiolaceoniger*" ont pu être isolées des sols en utilisant l'un ou l'autre des deux milieux développés à partir de l'analyse des données phénotypiques utilisées dans l'étude de regroupement originale. Le premier milieu contient du mannitol, de l'hydroxyproline, de la rifampicine (10 µg / ml) et violet cristal (1.0 µg / ml). Le second contenait du mélézitose, de l'acide DL-a-amino-n-butérique, de la rifampicine (10 µg / ml) et de l'oléandomycine (25 µg / ml). L'analyse des données présentées dans l'étude originale pourrait être utilisée pour développer des milieux sélectifs sur le plan nutritionnel pour d'autres groupes de grappes phénotypiques issus de cette étude (Labeda, 1990).

Tableau 8 : Antibiotiques sélectifs utilisés dans la sélection des actinobactéries (Labeda, 1990).

Amendement aux antibiotiques	Sélection pour
Gentamicine (2-5 µg/ml)	<i>Streptosporangium</i> <i>Actinomadura</i>
Gentamicine 10 µg/ml	<i>Micromonospora</i>
Kanamycine (25 µg/ml, 25°C)	<i>Actinomadura</i>
Acide nalidixique (20 µg/ml), penicilline G (10 U/ml) et potassium tellarite (0.005%)	<i>Rhodococcus</i>
Novobiocine (10-15 µg/ml)	<i>Actinoplanetes</i>
Novobiocine (100 µg/ml)	<i>Actinomadura</i>
Novobiocine (25µg/ml) et streptomycine (25µg/ml)	<i>Glycomyces</i>
Penicilline G (5-10 µg/ml) et Acide nalidixique (15µg/ml).	<i>Saccharothrix</i>
Penicilline G (1 µg/ml) et polymyxine B (5 µg/ml)	<i>Actinbactéries</i>
Rifampicine (25 µg/ml)	<i>Thermoactinobactéries</i>
Streptomycine (25 µg/ml)	<i>Actinomadura</i>
Tetracyclines	<i>Micromonospora</i>
Tunicamycine (20 µg/ml) et Acide nalidixique (30 µg/ml).	<i>Nocardia</i>
Vancomycine (1-10 µg/ml) et polymyxin B (5 U/ml)	<i>Amycolatopsis</i>

4.2.4. Méthode d'ensemencement :

Le placage de stries peut être réalisé avec un certain nombre d'instruments différents de haut en bas, sont représentés des cure-dents (aplatis et non ronds), une boucle de fil, une boucle en plastique jetable et des bâtons en bois (Figure 22). Ce sont une alternative peu coûteuse aux boucles en plastique jetables et peuvent être particulièrement utiles lorsque vous travaillez avec un échantillon environnemental tel que le sol qui contient probablement des bactéries sporogènes (Sanders, 2012).

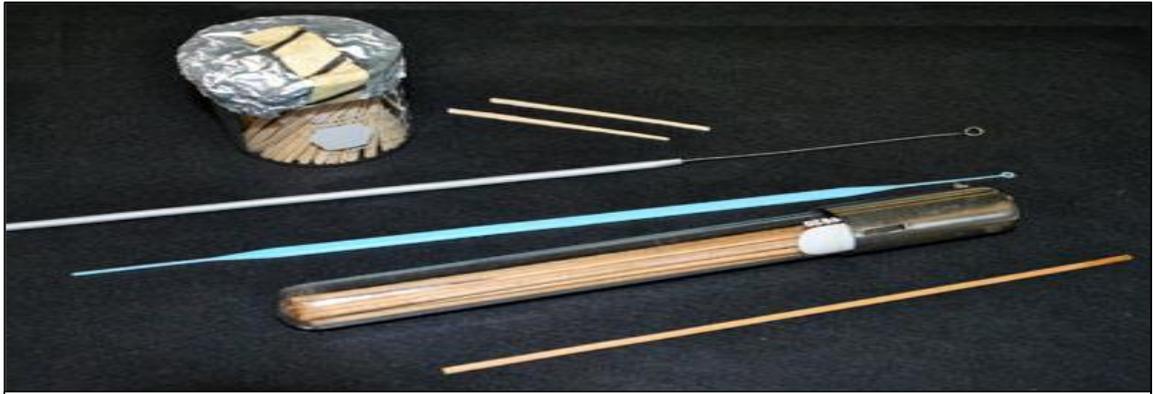


Figure 22 : Instruments utilisés pour la technique des stries (Sanders, 2012).

Étiquette autour du bord du fond (pas le couvercle) d'une plaque de gélose avec au moins votre nom, la date, le type de milieu de croissance et le nom d'échantillon à plaquer sur le support (Sanders, 2012).

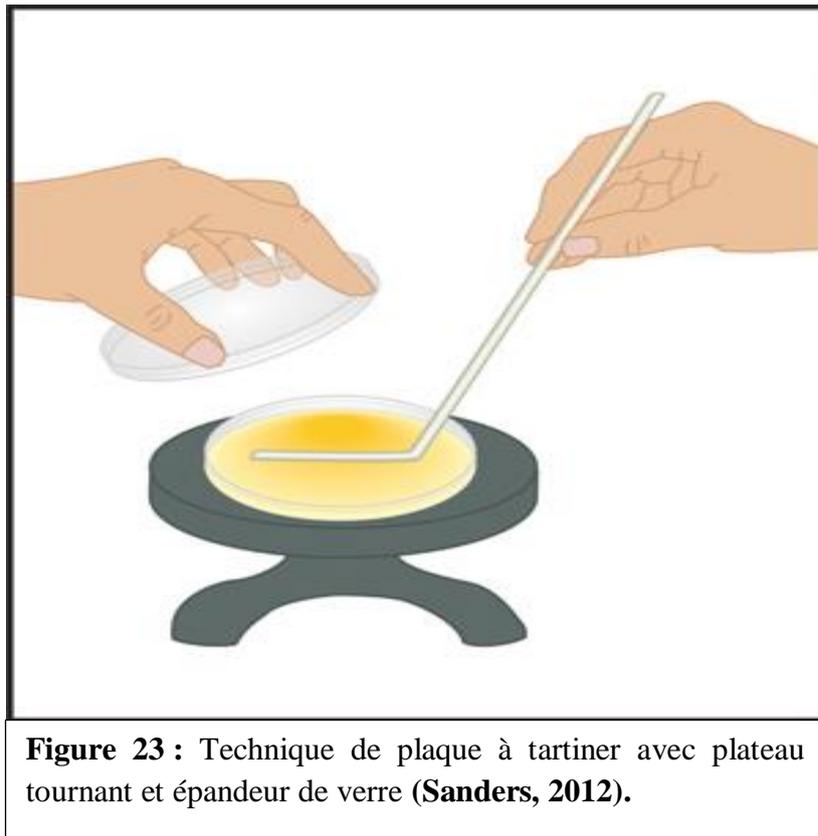
- Inclure le facteur de dilution en cas de dilutions en série de placage.

Les plaques doivent être complètement sèches sans condensation sur le couvercle et préchauffées à température ambiante avant l'étalement. Si les plaques sont conservées à 4 °C, retirez-les plusieurs heures ou même la veille. Étalez-les en petites piles décalées de pas plus de 2-3 assiettes et laissez-les sécher (Sanders, 2012).

- Centrez la plaque sur le plateau tournant (Figure 23).

- Obtenez votre échantillon, qui devrait être une culture en bouillon ou une suspension de cellules produites en mélangeant des cellules d'une colonie dans un tampon ou une solution saline.

- Les échantillons peuvent être dérivés d'une série de dilution d'un seul échantillon.
- Le volume de l'échantillon à plaquer doit être compris entre 0,1 et 0,2 ml (Sanders, 2012).



4.2.5. Choix des isolats d'actinobactéries :

Les colonies bactériennes présentant les caractéristiques sont sélectionnées lors de l'incubation, les boîtes de Pétri ensemencées sont périodiquement examinées à l'œil nu et au microscope optique (grossissement x10 et x40). Les observations permettent de reconnaître les isolats bactériens recherchés. Selon certains auteurs, ces colonies bactériennes sont incrustées dans les milieux de cultures, avec un aspect farineux corné au bord frangé au centre proéminent (Girard et Rougieux, 1967).

4.2.6. Purification et conservation :

➤ Purification :

Les colonies d'actinobactéries sélectionnées sont repiquées délicatement à l'aide d'une pointe stérile et purifiées par ensemencement en stries sur milieu ISP2 (Annexe1). Les souches pures, numérotés et catalogués, sont ensemencées sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis (Goudjal, 2014).

➤ Conservation :

Les souches bactériennes, en particulier lorsque l'on n'a que quelques isolats, sont fréquemment maintenues par passage en série sur des pentes de gélose. Cette méthode ne doit pas être utilisée pour maintenir les actinobactéries car le passage en série les prédispose à une dégénérescence entraînant

une perte de capacité à produire le métabolite souhaité. Les causes de cette perte d'expression génique chez les actinobactéries ne sont pas encore entièrement comprises (Nisbet, 1980).

La méthode la plus utilisée pour la conservation à long terme des souches d'actinobactéries est la lyophilisation. Les cultures peuvent être cultivées sur des pentes ou dans des flacons secoués. Les temps d'incubation varient d'une souche à l'autre, mais les cultures en flacons agités sont généralement récoltées au milieu à la fin de la phase log, tandis que les cultures inclinées sont autorisées à atteindre une sporulation optimale (Alexander *et al.*, 1980) (Tableau 9).

Tableau 9 : Les agents cryoprotecteurs pour conservation des actinobactéries (Labeda, 1990).

Agents cryoprotecteurs	CDA		VS	CDC	CDS
Lait écrémé	Stérilisation à double résistance	10 % Glycérine.	0.2 mL	Congélation à une T° à -45°C	- En boîtes pré remplies d'azote liquide. - Gardé dans le noir. - À une température de -4°C jusqu'à (-10 : -70 °C).
Sérum boeuf	Stérile				
Bouillon Stérile	Contient 12% saccharose				

CDA : condition des agents.

VS : Volume de suspension.

CDC : condition de conservation.

CDS : condition de stockage.

5. Identification morphologique, chimique et physiologique des souches d'actinobactéries isolées :

5.1. Etude morphologique :

Les actinobactéries présentent la plus grande différenciation morphologique parmi les bactéries à Gram positif; cependant, la structure cellulaire des actinobactéries est typique des procaryotes et totalement différente des champignons. Toute la structure d'une cellule d'hyphes correspond à une organisation bactérienne: le cytoplasme contient des régions d'ADN génomique, des ribosomes et diverses inclusions, vraisemblablement des substances de réserve telles que des polyphosphates, des lipides ou des polysaccharides. Les actinomycètes classiques ont un mycélium radial bien développé. Selon la différence de morphologie et de fonction, le mycélium peut être divisé en mycélium substrat et mycélium aérien (Figure 24). Certaines actinobactéries peuvent former des structures compliquées, telles que des spores, une chaîne de spores (Li *et al.*, 2016b).

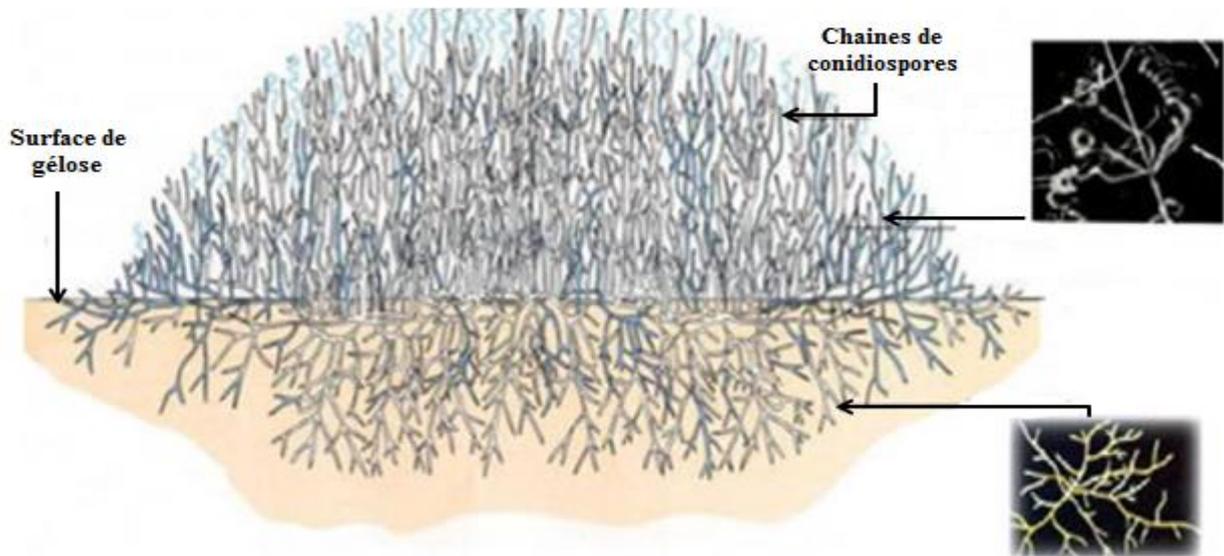


Figure 24 : Colonie d'actinobactéries poussant sur gélose (Li *et al.*, 2016b).

5.1.1. Macromorphologie :

Cette étude consiste à noter, au 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour d'incubation à 30°C, la croissance de la souche, l'aspect et la couleur des mycélium aérien et du substrat et la production et la couleur des pigments diffusibles sur les milieux de culture suivants : l'ISP₂, l'ISP₃ et l'ISP₄ préconisés lors de « l'International *Streptomyces* Project » (Lamari *et al.*, 2006) et Bennett. La composition des milieux est donnée en annexe 1.

Les différentes couleurs sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color : ISCC-NBS) (Lamari *et al.*, 2006).

5.1.2. Micromorphologie :

Les microscopes sont les instruments traditionnels utilisés pour évaluer les actinobactéries, et ils restent des outils indispensables pour explorer la diversité morphologique présente chez les actinobactéries. Habituellement, la morphologie de base des hyphes et des spores est observée par microscopie optique, et les structures microscopiques des hyphes et des spores à la surface sont observées au microscope électronique à balayage (MEB), et la structure ultramicroscopique des flagelles et de la cellule des spores est observée au microscope électronique à transmission (TEM) (Figure 25) (Li *et al.*, 2016b).

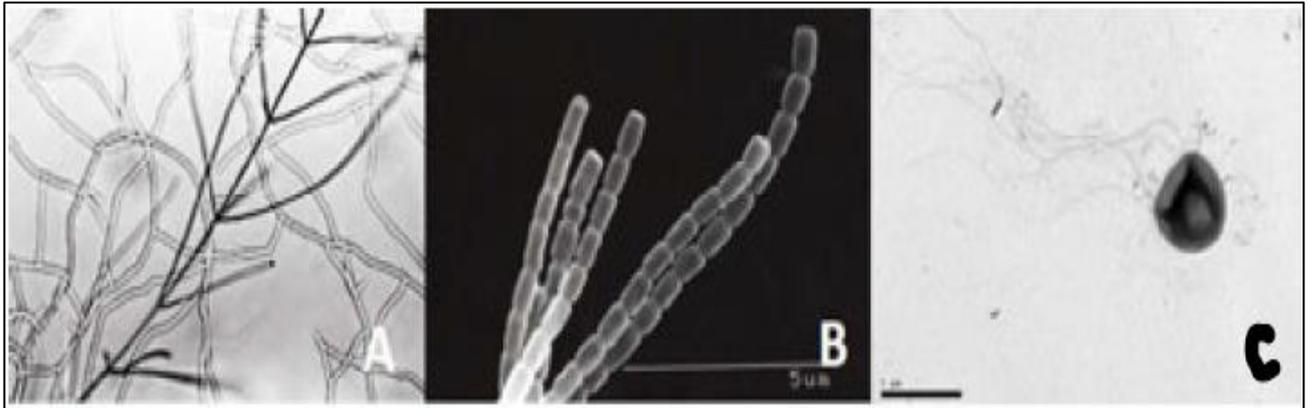


Figure 25 : Observation morphologique (Li *et al.*, 2016b).

Note :(A) Micrographie légère de *Streptomyces nobilis* SANK 60192T . (B) Micrographie MEB de *Streptomyces nobilis* SANK 60192T, Bar, 5 µm. C) Micrographie TEM de *Kineococcus gynurea* 103943T . Cocci mobiles avec flagelles polaires. Bar, 1 µm.

La méthode d'incorporation de transplantation est généralement utilisée dans l'observation morphologique des actinobactéries. Les géloses plates appropriées sélectionnées (2 à 4 milieux) ont été creusées dans un trou rectangulaire de 1 cm de large, inoculées au bord du trou, puis recouvertes d'une lamelle stérile. L'appartement est cultivé à bonne température. Les lamelles sont retirées à différents moments (généralement 5, 10, 14 et 20 jours) et observées en microscopie optique. Selon le graphique de la microscopie à la lumière, la bonne zone est choisie, qui est découpée en morceaux de 1 x 1 cm, pulvérisée directement sur la feuille de couverture, prise de photos en microscopie électronique à balayage (Figure 26) (Li *et al.*, 2016b). Afin d'éviter la déformation de la forme, la fixation est généralement effectuée par incubation dans une solution d'un fixateur chimique tamponné, tel que le glutaraldéhyde (2,5%, 1,5 h), parfois en combinaison avec du formaldéhyde et d'autres fixateurs et éventuellement suivie d'une post-fixation avec du tétroxyde d'osmium. Le tissu fixé est ensuite déshydraté. Étant donné que le séchage à l'air provoque un effondrement et un rétrécissement, ceci est généralement obtenu en remplaçant l'eau dans les cellules par des solvants organiques tels que l'éthanol (respectivement 30, 50, 70, 90, 100%, déshydratation toutes les 15 min) ou de l'acétone, et remplacement de ces solvants à leur tour par un fluide de transition tel que le dioxyde de carbone liquide par séchage au point critique. Le dioxyde de carbone est finalement éliminé à l'état supercritique, de sorte qu'aucune interface gaz-liquide n'est présente dans l'échantillon pendant le séchage. L'échantillon sec est généralement monté sur un talon d'échantillon à l'aide d'un adhésif tel que de la résine époxy ou du ruban adhésif double face électriquement conducteur, et enduit de pulvérisation d'or ou d'alliage or/palladium avant l'examen au microscope (Li *et al.*, 2016b).

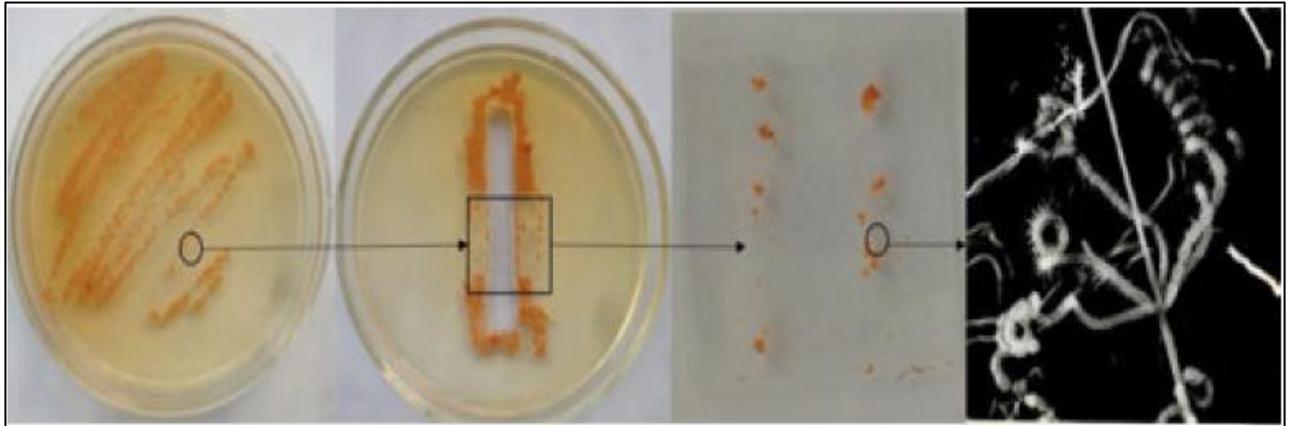


Figure 26 : Observation des actinobactéries avec méthode d'incorporation de transplantation (Li *et al.*, 2016b).

5.2. Etude chimique :

Cette étude consiste, en plus des études morphologiques, à compléter l'identification du genre. Les analyses sont effectuées sur des hydrolysats ou des extraits cellulaires, par chromatographie descendante sur papier pour la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique ou DAP (forme LL ou DL) et la présence ou non de glycine au niveau pariétal, par chromatographie ascendante sur couche mince, pour connaître la composition cellulaire en sucres et en phospholipides membranaires et pour noter la présence ou non d'acides mycoliques. L'étude chimique est un bon critère de distinction des différents groupes d'actinobactéries (Nouredine, 2006).

5.2.1. Obtention de la biomasse mycélienne :

Appelé mycélium végétatif ou mycélium primaire, le mycélium du substrat se développe dans le milieu ou à la surface du milieu de culture (Li *et al.*, 2016a). Les isolats sélectionnés et retenus pour la suite de l'étude sont ensemencés dans des tubes contenant 10 ml de milieu Williams liquide 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.

La fonction principale du mycélium du substrat est l'absorption des nutriments pour la croissance des actinobactéries. Au microscope, les mycéliums du substrat sont minces, transparents, sombres et plus ramifiés que les hyphes aériens. Les hyphes simples ont une épaisseur d'environ 0,4 à 1,2 μm , ne forment généralement pas de diaphragmes et de fractures, capables de développer des branches. Les groupes minoritaires (comme la *Nocardia*), rudimentaires à largement ramifiés comme les racines, les hyphes du substrat se fragmentent souvent *in situ* ou lors d'une perturbation mécanique en éléments coccoïdes à bâtonnets non mobiles lorsqu'ils sont cultivés à un certain stade (Figure 27A). Les actinosynnèmes sont différenciés en mycéliums de substrat avec des hyphes à

longues ramifications qui pénètrent dans la gélose et se développent et forment des synnémés (Figure 27B). Dans certains genres, les hyphes forment des sclérotés (Figure 27C) (Li *et al.*, 2016a).

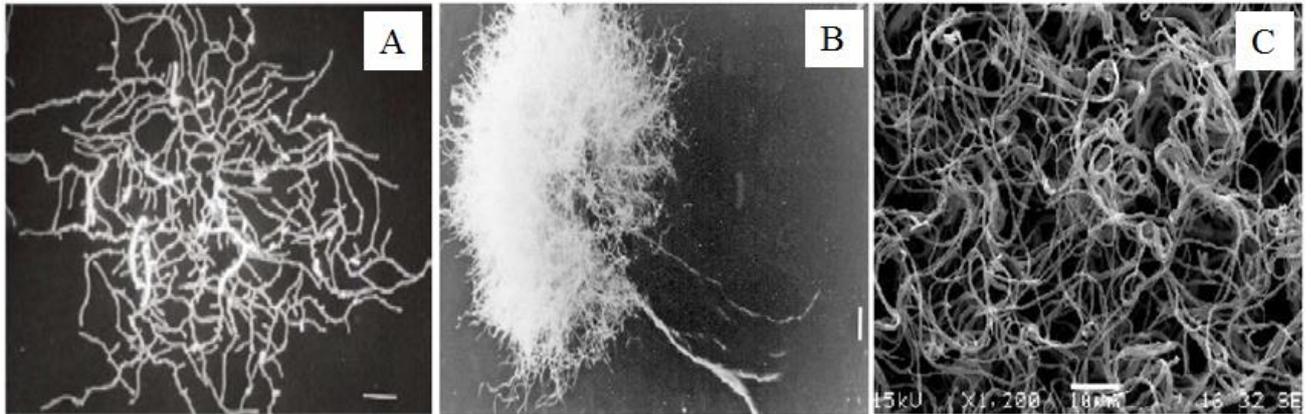
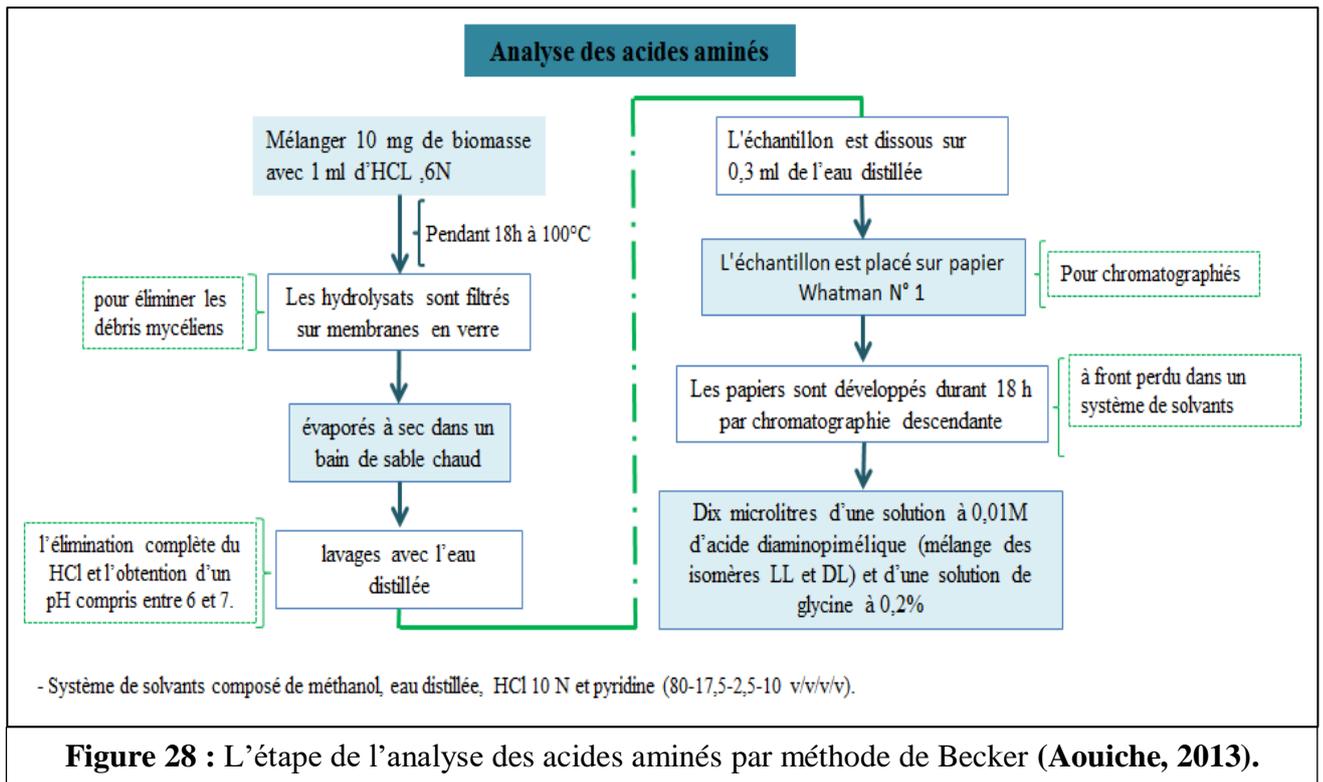


Figure 27 : La fragmentation du mycélium du substrat et la véritable ramification (Li *et al.*, 2016a). (A) *Nocardia asteroides*, (B) *Actinosynnema mirum*, (C) *Streptoalloteichus tenebrarius*.

Les mycéliums du substrat sont des couleurs blanches, jaunes, oranges, rouges, vertes, bleues, violettes, brunes, noires et autres; certains hyphes peuvent produire des pigments solubles dans l'eau ou liposolubles. Le pigment soluble dans l'eau peut s'infiltrer dans le milieu de culture, ce qui rend le milieu avec la couleur correspondante. Le pigment non soluble dans l'eau (ou liposoluble) fait la colonie avec la couleur correspondante. La couleur du mycélium du substrat et la présence éventuelle de pigments solubles fournissent des références importantes dans la détermination de nouvelles espèces (Li *et al.*, 2016a).

5.2.2. Analyse des acides aminés pariétaux :

La détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous forme LL ou DL (méso), et la présence ou l'absence de la glycine sont réalisées selon la méthode de Becker *et al.* (1964) (Figure 28).



Les chromatogrammes sont révélés par une solution à 0,2% (w/v) de ninhydrine dissoute dans l'éthanol, suivie d'un chauffage à 100°C pendant 5 min. Les tâches de DAP sont de couleur olive virant en quelques minutes au jaune vif. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL. La glycine apparaît de couleur violette et migre plus rapidement que les deux isomères de DAP (Becker *et al.*, 1964).

5.2.3. Analyse des sucres cellulaires :

Pour l'identification des actinobactéries, l'analyse des sucres de cellules entières est nécessaire. Cinq modèles de sucre à cellules entières ont été reconnus, basés sur la présence de sucres distincts (arabinose et galactose, madurose, sucres non diagnostiques, arabinose et xylose, rhamnose). L'analyse des sucres des préparations de cellules entières prend moins de temps et permet souvent une allocation au chimiotype de paroi correct (Wang et Jiang, 2016).

Comme les méthodes utilisées pour préparer des extraits de cellules entières sont similaires, la procédure d'extraction et d'analyse du sucre de cellules entières rapportée par Hasegawa *et al.* sont brièvement décrits. Bien que la procédure de Stanek et Roberts pour la chromatographie en couche mince du sucre de diagnostic sur des plaques de cellulose fonctionne raisonnablement bien, elle n'est pas en mesure de séparer le mannose et l'arabinose (Figure 29). Nous avons décrit une méthode modifiée en changeant le solvant développé pour séparer le mannose et l'arabinose de la manière suivante:

- Ajouter une boucle de masse cellulaire dans une ampoule, ajouter 0,1 ml de HCl 0,25 N dans l'ampoule, sceller et bain de sable pour hydrolyser pendant 15 min à 121°C.
- Repérez 2 µl au fond d'une plaque en couche mince de 10 × 20 cm recouverte de cellulose.
- Placer 1 µl de solution étalon 1 contenant du rhamnose, du xylose et du mannose, et la solution étalon 2 contenant du ribose, du madurose, de l'arabinose et du glucose sur la même plaque, respectivement.
- Développer avec de l'acétate d'éthyle–pyridine–acide acétique–eau (8:5:1:5, v/v) pendant 3 h et sécher les plaques dans une armoire à fumées.
- Répétez la quatrième étape une fois.
- Vaporiser la plaque très légèrement avec du phtalate d'aniline acide et chauffer à 100°C pendant 4 min pour révéler les taches (Wang et Jiang, 2016).

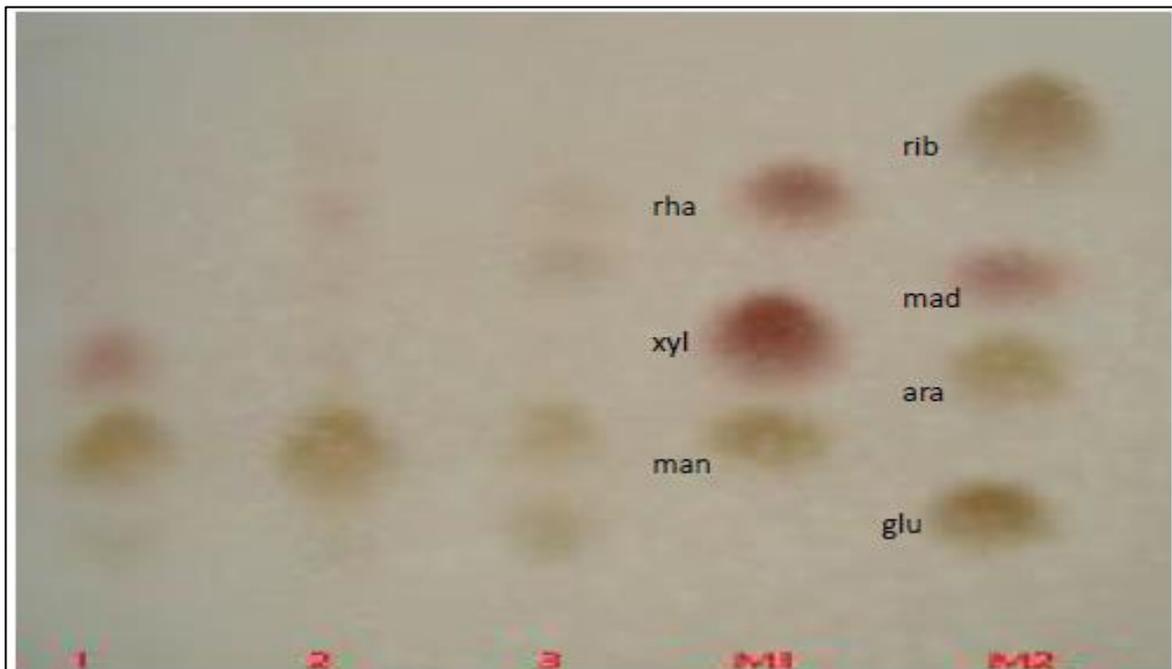


Figure 29 : Séparation des sucres cellulaires entiers de l'hydrolysats cellulaire entier par chromatographie sur couche mince (Wang et Jiang, 2016).

Note :(rha = rhamnose, xyl = xylose, man = mannose, rib = ribose, mad = madurose, ara = arabinose, glu = glucose). 1,2 et 3 = les échantillons. M1 et M2 = Témoin

5.2.4. Recherche des acides mycoliques pariétaux :

Les acides mycoliques sont des acides gras 2-alkyl 3-hydroxy de haut poids moléculaire à longue chaîne (jusqu'à 90 atomes de carbone) trouvés dans des représentants de *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordona*, *Myobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Turicella* et *Tsukumurellu* (Wang et

Jiang, 2016). Pour l'extraction et l'analyse des acides mycoliques (Tableau 10), différentes méthodes ont été décrites basées sur la CCM, la GC ou la CLHP (**Wang et Jiang, 2016**).

Tableau 10 : L'extraction et l'analyse des acides mycoliques à partir de cellules entières (**Minnikin et Goodfellow, 1980**).

Extraction d'acides mycoliques à partir de cellules entières

Dans cette section, nous décrivons l'extraction et l'analyse des acides mycoliques sur la base de la CCM.

- Ajouter des cellules lyophilisantes de 50 à 100 mg dans un tube à essai propre et sec.
- Ajouter 3 ml de solvant du mélange de méthanol, de toluène et de conc. acide sulfurique (30:15:1) dans le tube à essai et sceller hermétiquement le tube à essai.
- Placer les tubes à essai dans un bain-marie à 75°C pendant la nuit ou 16-18 h.
- Refroidir le tube à essai à température ambiante et ajouter 2 ml d'éther de pétrole (p. b. 60-80), le mélange est agité et centrifugé pendant 10 min à basse vitesse (3000 tr / min), recueillir la phase solvant supérieure.
- Préparer une petite colonne d'hydrogénocarbonate d'ammonium et prélever la petite colonne avec de l'éther diéthylique.
- Pipeter la phase supérieure du solvant dans une petite colonne (env. 1 cm) d'hydrogénocarbonate d'ammonium et recueillir l'éluant dans un petit tube eppendorf (5 ml), puis laver à nouveau la petite colonne avec de l'éther diéthylique.
- Combiner l'éluant lavé et évaporer à sec sous pression réduite à 40°C sur un évaporateur rotatif.

Analyse des acides mycoliques à partir de cellules entières

Les acides mycoliques de cellules entières ont été analysés selon ce qui est décrit par **Minnikin *et al.* (1975)**

1. Dissoudre les acides mycoliques séchés dans 200 µl d'éther de pétrole, et placer 10 µl au fond d'une plaque en couche mince de 10 × 10 cm recouverte de gel de silice (Merck F254).
2. Développer avec de l'éther de pétrole, de l'acétone (95:5, v/v) utilisé pour le développement monodimensionnel et sécher les plaques dans une armoire à fumées.
3. Développer avec de l'éther de pétrole acétone (95:5, v/v), suivi, dans le second sens, par du toluène, des acétones (97:3) utilisées pour le système de développement bidimensionnel et sécher les plaques dans une armoire à fumées.
4. Coloration, vaporiser la plaque avec de l'acide molybdophosphorique et chauffer à 150°C pendant 5 min pour révéler les acides mycoliques

L'évaluation de la présence d'acide mycolique n'est recommandée que si d'autres résultats (par exemple, la morphologie de la corynéforme) attribuent l'isolat à identifier au groupe de bactéries corynéformes, mais la détection des acides mycoliques réduit fortement le nombre de parents possibles. Une identification plus poussée au niveau du genre est souvent possible par l'application

supplémentaire de quelques-unes des autres méthodes chimiotaxonomiques décrites (quinones, acides gras, lipides polaires et/ou sucres) (Wang et Jiang, 2016).

5.2.5. Analyse des Lipides polaires membranaires :

Les lipides polaires sont des composants importants des membranes plasmiques bactériennes. Les membranes plasmiques bactériennes sont composées de lipides polaires amphipathiques associés à des protéines membranaires spécifiques. Les lipides polaires amphipathiques sont constitués de groupes de tête hydrophiles généralement liés à deux chaînes d'acides gras hydrophobes. Les phospholipides sont les lipides polaires les plus courants (Wang et Jiang, 2016). Pour la description et la différenciation des actinobactéries, cinq types de phospholipides (PI-PV) ont été reconnus (Tableau 11).

Tableau 11 : Types de phospholipides (Lechevalier *et al.* 1977).

Types de phospholipides	Phospholipides caractéristiques
P I	- Pas de phospholipides azotés
P II	- Un seul phospholipide azoté phosphatidyl éthanolamine
P III	- Phosphatidylcholine et phospholipide caractéristique
P IV	- Phospholipides contenant de la glucosamine
P V	- Phosphatidylglycérol et phospholipides contenant de la glucosamine

Dans les études taxonomiques, les lipides polaires ont été largement analysés par chromatographie en couche mince à une ou deux dimensions. La méthode classique d'extraction des lipides polaires est un processus long qui prend au moins 13 jours du début à la fin. Par la suite, des procédures plus rapides. Utilise un méthanol monophasique pour l'extraction des lipides polaires; l'ajout de plus de chloroforme et d'eau force une séparation de phase. La couche inférieure, principalement du chloroforme, contient les lipides polaires, tandis que les composants non lipidiques restent dans la phase aqueuse supérieure. Dans cette section, une procédure modifiée d'extraction des lipides polaires est décrite :

- Placez environ 100 à 200 mg de masse de cellules séchées dans un tube de 50 ml avec un bouchon à vis revêtu de téflon.
- Ajouter 2 ml de NaCl aqueux à 0,85%, puis 15 ml de méthanol.
- Chauffer 10 min à 100°C dans un bain bouillant et laisser refroidir à température ambiante.
- Ajouter 10 ml de chloroforme et 6 ml de NaCl aqueux à 0,85%, puis agiter pendant 10 min.

- Centrifuger à 8 000 tr / min pendant 10 min, recueillir la couche inférieure.
- La couche inférieure d'un ballon est évaporée à sec sous pression réduite à 40°C sur un évaporateur rotatif (Wang et Jiang, 2016) .

L'identification des différents lipides s'effectue par comparaison de leurs valeurs rapport frontal dans les plaques et comportement de coloration (Wang et Jiang, 2016) .

5.2.6. Analyse des acides gras cellulaires :

L'analyse des profils d'acides gras est bien introduite pour la chimiotaxonomie des bactéries. La préparation de la biomasse pour l'analyse des acides gras doit être effectuée pour s'assurer que les bactéries sont cultivées dans des conditions normalisées. L'extraction des acides gras peut être réalisée avec de la biomasse (environ 40 mg de poids humide récoltés à partir de plaques de gélose). Pour la plupart des actinobactéries, le lecteur peut sélectionner la gélose de soja trypticase comme milieu de croissance, mais pour les actinobactéries provenant d'environnements extrêmes, le lecteur doit sélectionner le milieu de croissance optimal, ainsi que les milieux possibles doivent omettre le matériel contenant des acides gras, tels que les préadolescents et le sérum (Wang et Jiang, 2016).

Différentes méthodes ont été décrites impliquant l'acide ou la base. Dans les études taxonomiques, il est important d'utiliser une méthode cohérente. Nous présentons ici une méthode de préparation d'esters méthyliques d'acides gras à partir de matériaux cellulaires humides entiers, développée par (Sasser, 1990). Préparation des réactifs Quatre réactifs sont nécessaires pour libérer, estérifier et extraire les acides gras des cellules vivantes saponification, méthylation et solvant d'extraction, lavage de base et reactif R1, R2 et R3, R4 (voir l'Annexe 1) (Wang et Jiang, 2016).

Cinq étapes impliquées dans l'extraction des acides gras de la biomasse (Figure 30):

Pour l'identification des profils d'acides gras au niveau de l'espèce, un système intégré, comprenant un appareil de chromatographie en phase gazeuse avec logiciel d'identification (le Système d'identification microbienne Sherlock) est requis (Wang et Jiang, 2016).

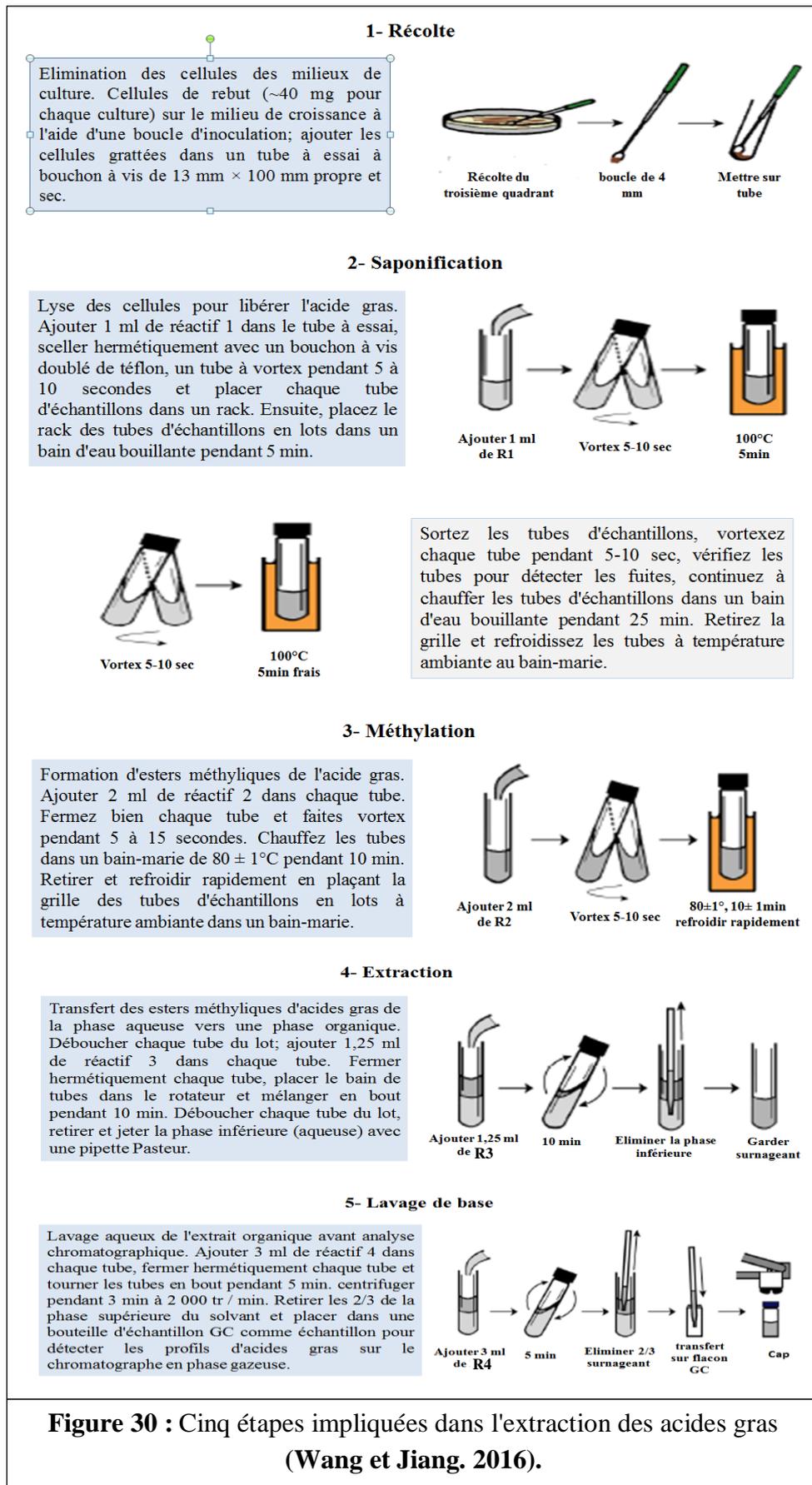


Figure 30 : Cinq étapes impliquées dans l'extraction des acides gras (Wang et Jiang, 2016).

5.3. Etude physiologique et système d'identification numérique:

5.3.1. Etude physiologique :

Certaines caractéristiques phénotypiques des actinobactéries sont d'une importance primordiale pour la description d'un genre ou d'une espèce. Plusieurs problèmes doivent être pris en compte lors de la planification des tests physiologiques des actinobactéries (Li *et al.*, 2016a).

5.3.1.1. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des souches :

Les expériences de tolérance au sel testent principalement la capacité de tolérance de l'organisme au NaCl et à d'autres sels et déterminent la concentration optimale pour la croissance. Inoculer des milieux liquides contenant une gamme de concentrations de NaCl (généralement de 0 à 30%, P/V ou concentrations molaires relatives) et mesurer la réponse de croissance de manière turbidimétrique. Le milieu de Bennett ou le milieu YIM38 ou le milieu nutritif peut être utilisé comme milieu de base. Pour certaines actinobactéries marines, le NaCl seul ne peut pas remplacer l'eau de mer filtrée, qui doit être stérilisée par filtration et ajoutée de manière aseptique au milieu stérilisé. Même si de l'eau de mer est utilisée, il peut être nécessaire de la vieillir pendant quelques semaines dans un récipient en verre dans l'obscurité pour être efficace (Li *et al.*, 2016a).

5.3.1.2. Effet de la température sur la croissance des souches :

Incuber les cultures à différentes températures; à l'aide d'incubateurs à température constante ou de bains d'eau, mesurer la réponse de croissance des actinobactéries. La plage de température testée est généralement de 0°C à 75°C. En général, les expériences de température utilisent du milieu solide au lieu du bouillon afin de mieux observer (Li *et al.*, 2016a).

Les souches sont ensemencées chacune sur cinq boîtes de Pétri contenant le milieu SCA, l'incubation est réalisée aux températures suivantes : 28°C, 30°C, 37°C, 40°C et 45°C. La croissance des souches est évaluée après 7 à 10 jours d'incubation (Souagui, 2015).

5.3.1.3. Effet du pH sur la croissance des souches :

Une partie essentielle de la description de toute actinobactérie est la gamme de valeurs de pH auxquelles elle peut se développer, ainsi que le pH optimal pour la croissance. Mesurer les réponses de croissance d'un inoculum dized standard en utilisant un milieu basique (milieu de Bennett ou milieu YIM38 ou milieu nutritif) à différentes valeurs de pH. Le milieu liquide doit être utilisé pour les tests de pH, pour mesurer les réponses de croissance turbidimétriquement. La sélection du tampon est critique. Un tampon doit être utilisé dans la plupart des milieux pour maintenir un pH stable pour la croissance de la souche d'essai. Les tampons sont les plus efficaces à leurs valeurs pKa et doivent être choisis dans cet esprit. Quelques tampons biologiques utiles sont énumérés dans le tableau 12. Certains tampons tels que le citrate, le succinate ou la glycine peuvent être métabolisés par l'organisme testé. D'autres peuvent être toxiques. Parfois, une combinaison de tampons peut être utile. Certains tampons (bons tampons) sont non

métabolisables, non toxiques, ont une faible réactivité avec les ions métalliques et présentent d'autres caractéristiques souhaitables. Les sels de phosphate sont les plus couramment utilisés car ils sont efficaces dans la gamme de croissance de la plupart des bactéries, sont généralement non toxiques et fournissent une source de phosphore pour l'organisme (Li *et al.*, 2016a).

Tableau 12 : Tampons biologiques communs, leurs plages de pH effective et leurs valeurs de pKa à 25°C (Li *et al.*, 2016a).

Tampon	Plage de pH efficace	pKa (25°C)
Maleate (Sel d'acide maléique)	1.2–2.6	1.97 (pKa1)
Phosphate (Sel d'acide phosphorique)	1.7–2.9	2.15 (pKa1)
Glycine	2.2–3.6	2.35 (pKa1)
Citrate (Sel d'acide citrique)	2.2–3.5	3.13 (pKa1)
Malate (Sel d'acide malique)	2.7–4.2	3.40 (pKa1)
Citrate (Sel d'acide citrique)	3.0–6.2	4.76 (pKa2)
Succinate (Sel d'acide succinique)	3.2–5.2	4.21 (pKa1)
Acetate (Sel d'acide acétique)	2.6–5.6	4.76
Malate (Sel d'acide malique)	4.0–6.0	5.13 (pKa2)
Succinate (Sel d'acide succinique)	5.5–6.5	5.64 (pKa2)
MES 2-(<i>N</i> -Morpholino)- acide éthanesulfonique	5.5–6.7	6.10
Maleate (Sel d'acide malique)	5.5–7.2	6.24 (pKa2)
Citrate (Sel d'acide citrique)	5.5–7.2	6.40 (pKa3)
ACES (<i>N</i> -(2-Acetamido)- acide aminoéthanesulfonique)	6.1–7.5	6.78
BES (<i>N,N</i> -Bis-(2-hydroxyethyl)-2- acide aminoéthanesulfonique)	6.4–7.8	7.09

Habituellement, il est nécessaire de tester la croissance des actinobactéries à partir de pH 4,0 à 13,0 et de déterminer la plage de pH de croissance de la souche et la valeur de pH optimale en utilisant le système tampon (Annexe 1). Des témoins négatifs pour chaque tampon ont été utilisés et le pH final a été déterminé à l'aide d'un indicateur d'acidité (Li *et al.*, 2016a).

5.3.1.4. Production de pigments mélanoides :

Technique d'études des pigments mélanoides est réalisée sur les milieux gélosés ISP6 et ISP7 recommandés à cet effet par Shirling et Gottlieb (Toumatia, 2015).

La formation de mélanine 10 µl de milieu liquide approprié ont été distribués dans des tubes à essai et inoculés avec une boucle remplie des spores des actinobactéries et soumis à un stade stationnaire à 27°C pendant sept jours. Le pigment mélanique a été estimé en prenant 2 ml de la culture et 1 ml de solution de substrat à 0,4% (L-tyrosine ou Ldopa). Le mélange réactionnel a été

incubé à 37°C pendant 30 min pour la Ltyrosine et 5 min pour la L-Dopa et une coloration rouge résultant de la formation de dopachromes a été observée et lue spectrophotométriquement à 480 nm. Lorsqu'il n'y a pas eu de coloration pendant ces périodes, le mélange réactionnel a été incubé pendant 2 h. Après l'incubation, de la mélanine s'est ensuite formée en 30 min (Dastager *et al.*, 2006). La production de pigments mélanoïdes est considérée positive quand une couleur brune apparaît après culture de quatre jours ou plus (Souagui, 2015) (Figure 31).



Figure 31: Pigments du potentiel d'actinobactéries (Dastager *et al.*, 2006).

5.3.1.5. Production de nitrate réductase et de lipase :

Le bouillon de nitrate est utilisé pour déterminer la capacité d'un organisme à réduire le nitrate (NO_3) en nitrite (NO_2) à l'aide de l'enzyme nitrate réductase. Il teste également la capacité des organismes à effectuer une nitrification sur les nitrates et les nitrites pour produire de l'azote moléculaire. La réaction de Griess a plus récemment été utilisée pour détecter les nitrites et les nitrates en tant que produits de l'oxyde nitrique synthase dans l'identification bactérienne (Granger *et al.*, 1966).

La production de nitrate réductase est réalisée sur un milieu liquide nitraté contenu dans des tubes à vis à raison de 4 mL par tube. L'actinobactérie est ensemencée dans deux tubes, puis incubée à 30°C. La lecture se fait après 5 et 10 jours en ajoutant successivement 0,2 mL des réactifs Griess I puis Griess II, et éventuellement, de la poudre de zinc si le résultat est négatif avec les deux réactifs (Toumatia, 2015).

L'activité lipasique peut être démontrée en utilisant des Tween, par exemple, Tween 80, Tween 40 et Tween 20. Les organismes lipolytiques se séparent de l'acide gras et les sels de calcium des acides gras produisent des zones opaques autour des colonies (Li *et al.*, 2016a).

Préparer un milieu de base. Stériliser à l'autoclave (121 °C, 20 min). Autoclave le Tween désiré séparément (121°C, 20 min). Refroidir le milieu de base à 45– 50°C, ajouter le Tween pour obtenir

une concentration finale de 1,0%, agiter jusqu'à dissolution complète du Tween et verser dans des assiettes. Inoculer les cultures sous forme de lignes à la surface de la gélose. Incuber jusqu'à 7 à 14 jours, en inspectant quotidiennement. Recherchez un halo opaque autour de la croissance (Sierra, 1957).

5.3.2. Système d'identification numérique API :

L'API (analytical profile index) est une classification des bactéries basée sur des expériences, permettant une identification rapide. Ce système est développé pour l'identification rapide des bactéries cliniquement pertinentes. Pour cette raison, seules les bactéries connues peuvent être identifiées. Il a été inventé dans les années 1970 aux États-Unis par Pierre Janin d'Analytab Products, Inc. Actuellement, le système de test API est fabriqué par bioMérieux (Li *et al.*, 2016a). La gamme API a introduit une version standardisée et miniaturisée des techniques existantes, jusque-là compliquées à réaliser et difficiles à lire. Les systèmes API peuvent déterminer simultanément plus de 20 éléments d'indicateurs biochimiques. Choisissez la bande API appropriée en fonction des différents groupes bactériens. La bande API est constituée de plus de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests classiques sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue le milieu (Figure 32) (Li *et al.*, 2016).

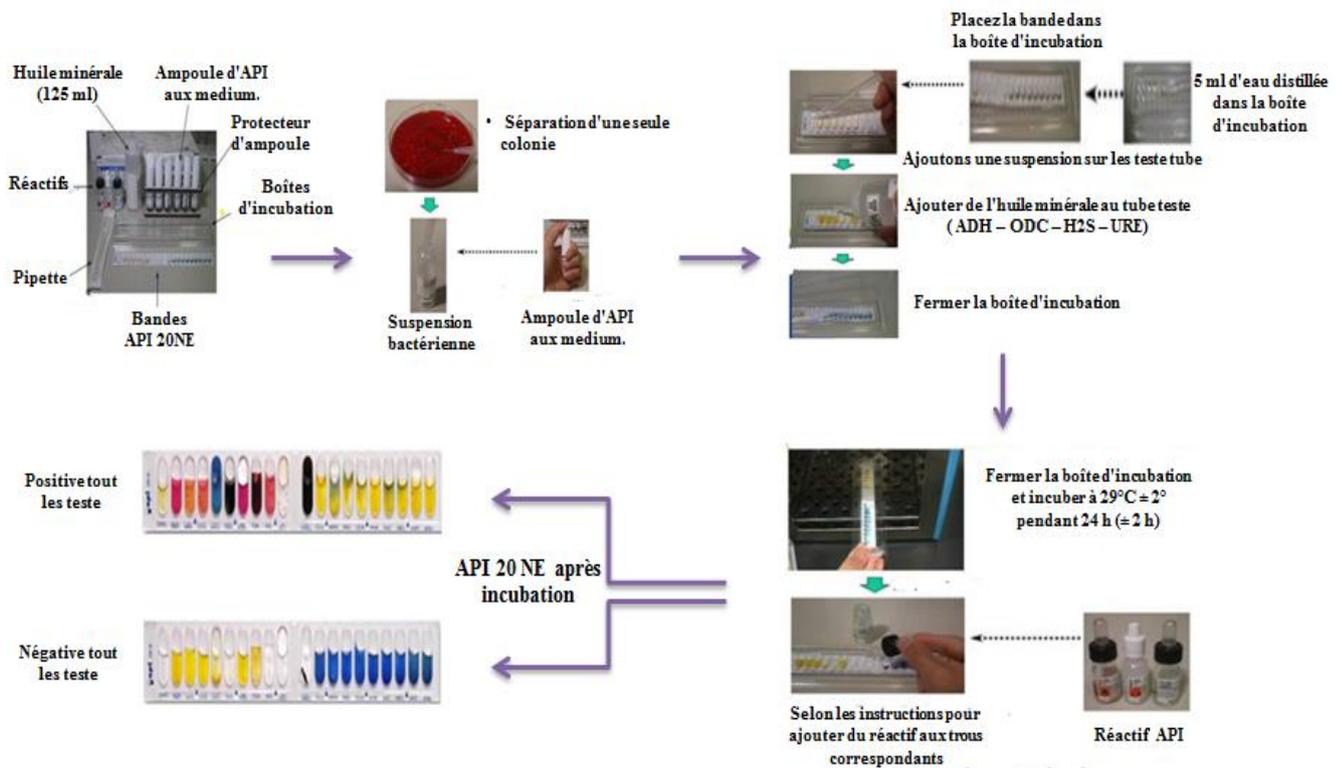


Figure 32: Organigramme opérationnel API 20NE (Li *et al.*, 2016a).

6. Identification moléculaire des souches d'actinobactéries isolées :

6.1. Extraction et purification de l'ADN génomique :

L'ADN est le porteur de l'information génétique et également la base de l'expression des gènes. Le phylogénétique moléculaire est la méthode de base pour l'identification des actinobactéries. Avant les méthodes génétiques, la première chose est l'extraction et la purification de l'ADN, et la qualité de l'ADN est la prémisses du succès ou de l'échec de l'expérience. Ce qui suit doit être remarqué:

- **Premièrement**, éviter les températures élevées
- **Deuxièmement**, contrôler le pH à une certaine plage de pH (pH 5-9)
- **Troisièmement**, maintenir la force ionique du tampon, ce qui est important pour maintenir les configurations spatiales de l'ADN;
- **Et enfin**, réduire la perturbation de l'ADN au cours de l'extraction par des facteurs physiques, tels que l'oscillation à grande vitesse, le mélange et la congélation–décongélation (Xiu *et al.*, 2016).

Il y a beaucoup d'enzymes d'ADN dans l'environnement qui peuvent digérer l'ADN ou l'ARN, par conséquent, une partie du matériel utilisé dans l'extraction doit être stérilisé et des inhibiteurs d'enzymes doivent être ajoutés dans le tampon d'extraction en même temps. De plus, il est également important d'éviter la contamination de l'ADN exogène. Il y a plusieurs étapes d'extraction et purification pour obtenir la meilleure qualité d'ADN (Xiu *et al.*, 2016) (figure 33).

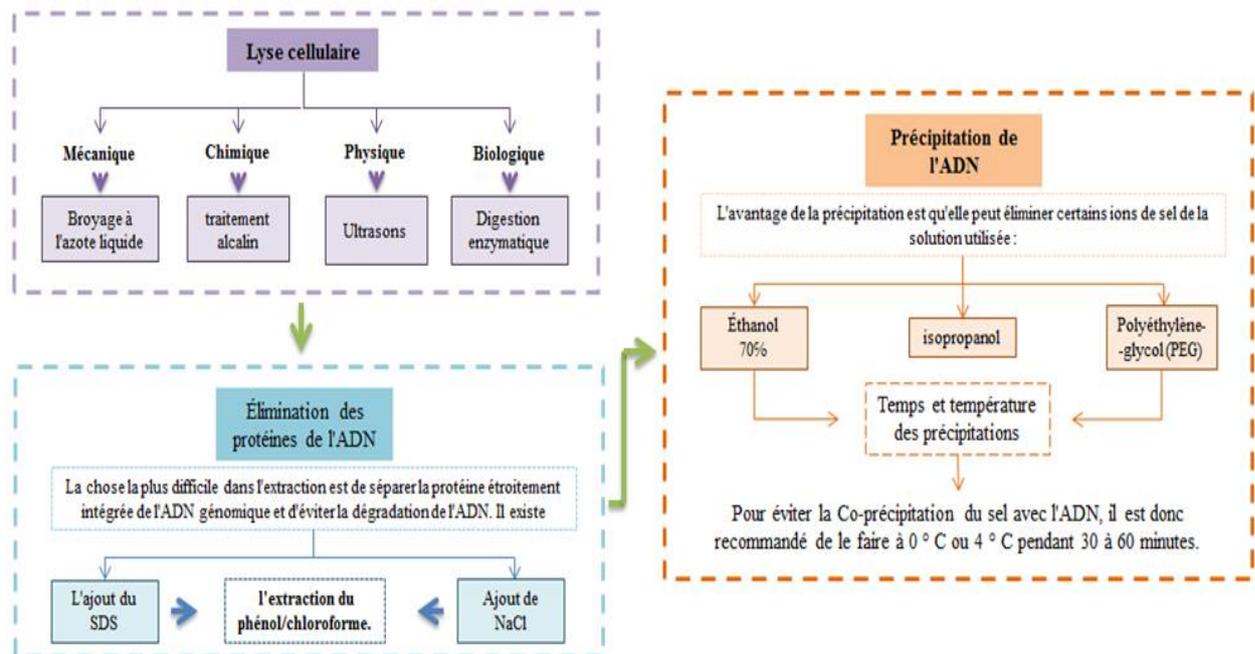


Figure 33 : Organigrammes pour les principales étapes de l'extraction et de la purification de l'ADN (Xiu *et al.*, 2016)

6.2. Amplification de la séquence d'ADNr 16S :

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique ingénieuse utilisée pour amplifier de façon exponentielle une séquence d'ADN cible spécifique (Xiu *et al.*, 2016). L'ADN ribosomique 16S est amplifié par PCR en utilisant deux amorces (Toumatia, 2015) (Tableau 13).

Tableau 13 : Spécificité de séquence des amorces PCR utilisées pour amplification (Al_husnan et Alkahtani, 2016).

Amorces	Séquence
24 F	(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
1492 R	(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')

La PCR typique est une réaction en trois étapes (Figure 34). L'amplification est réalisée dans:

- 1- Un volume de 50 µL de mélange réactionnel composé de 25 à 50 ng d'ADN génomique,
- 2- 0,5 µM de chaque amorce 27f et 1492r, 1X du tampon PCR (Annexe 1)
- 3- 200 µM du mélange dNTP et 1,5 U de Taq ADN polymérase.

L'amplification a été effectuée selon les conditions suivantes: dénaturation initiale de la matrice d'ADN à 98°C pendant 4 min, puis 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, hybridation à 52°C pendant 1 min et extension à 72°C pendant 2 min. A la fin des cycles, le mélange réactionnel a été maintenu à 72°C pendant 10 min pour l'élongation finale, puis refroidi à 4°C (Toumatia, 2015).

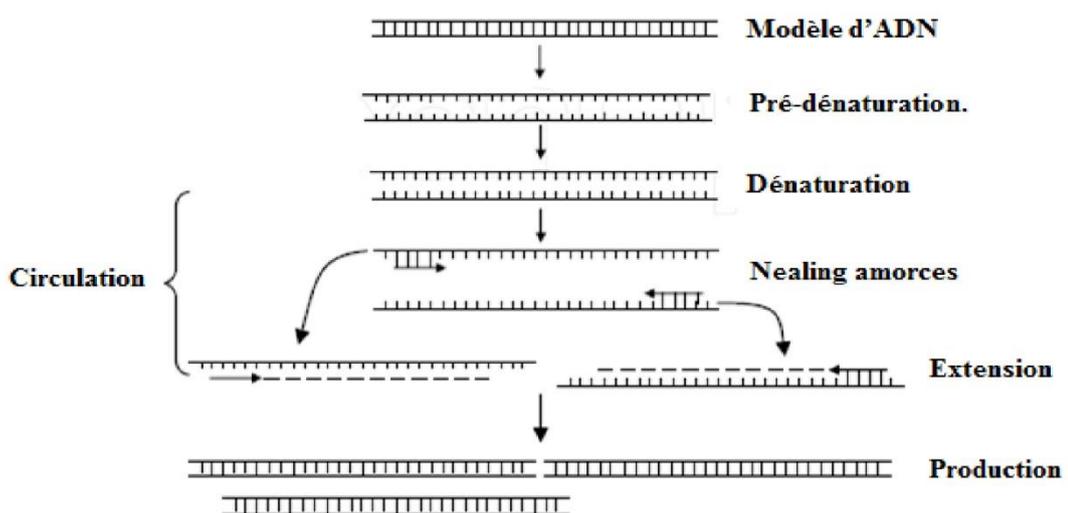


Figure 34 : Le principe de l'amplification de l'ADN (Xiu *et al.*, 2016).

6.3. Électrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est le moyen le plus efficace de séparer des fragments d'ADN de tailles variables allant de 100 pb à 25 kb. L'utilisation de l'électrophorèse sur gel d'agarose a révolutionné la séparation de l'ADN. Avant l'adoption des gels d'agarose, l'ADN était principalement séparé par centrifugation par gradient de densité de saccharose, ce qui ne donnait qu'une approximation de la taille. Pour séparer l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN est chargé dans des puits préfabriqués du gel et un courant est appliqué (Pei Yun *et al.*, 2012). Le squelette phosphaté de la molécule d'ADN (et d'ARN) est chargé négativement, par conséquent, lorsqu'ils sont placés dans un champ électrique, les fragments d'ADN migrent vers l'anode chargée positivement. Étant donné que l'ADN a un rapport masse/charge uniforme, les molécules d'ADN sont séparées par taille dans un gel d'agarose selon un motif tel que la distance parcourue est inversement proportionnelle au Log de son poids moléculaire (Figure 35) (Pei Yun *et al.*, 2012).

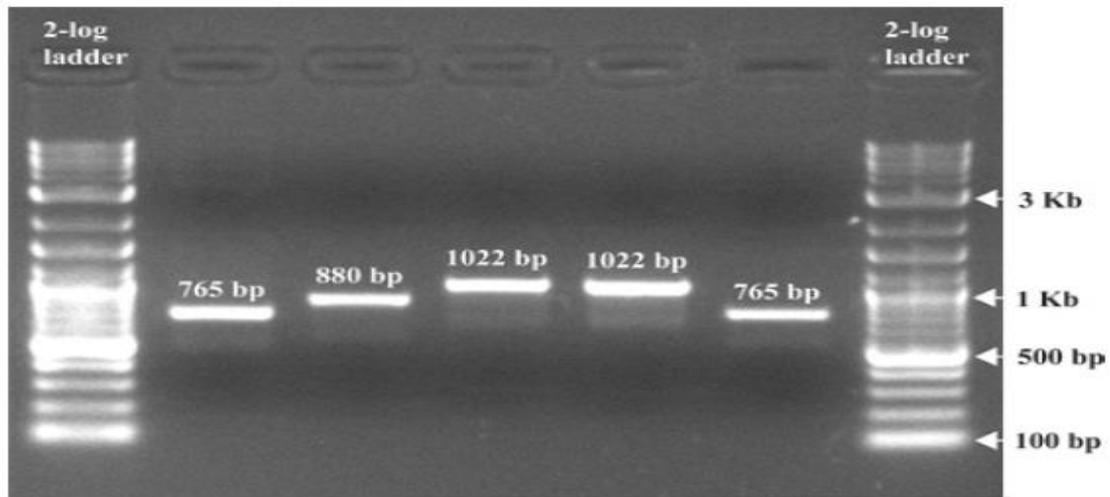


Figure 35: Image d'une électrophorèse post-gel (Pei Yun *et al.*, 2012).

6.4. Purification des bandes d'ADN à partir de gel d'agarose :

Pour purifier les bandes d'ADN sélectionnées à partir de gels d'agarose, un tube de 0,5 mL perforé dans le fond central avec une aiguille de seringue et emballé avec un petit gland de coton (un quart de volume de tube) a été utilisé. Le coton a été incorporé avec 0,59 TAE et pressé jusqu'à ce qu'aucun liquide ne sorte. Cet appareil a été placé dans un autre tube de 1,5 mL. Le morceau de gel contenant de l'ADN a été déposé sur le filtre de coton dans le tube puis centrifugé à 5200g pendant 5 min à température ambiante. L'ADN dans le liquide collecté a été quantifié spectrophotométriquement par une procédure standard et utilisé pour des expériences ultérieures (Tzec-Sima *et al.*, 2017).

Pour la comparaison de l'efficacité, toutes les procédures ont été effectuées en trois exemplaires (Figure 36). Les ADN extraits ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre à 260 nm et analysés sur gel d'agarose à 1% (Tzec-Sima *et al.*, 2017).

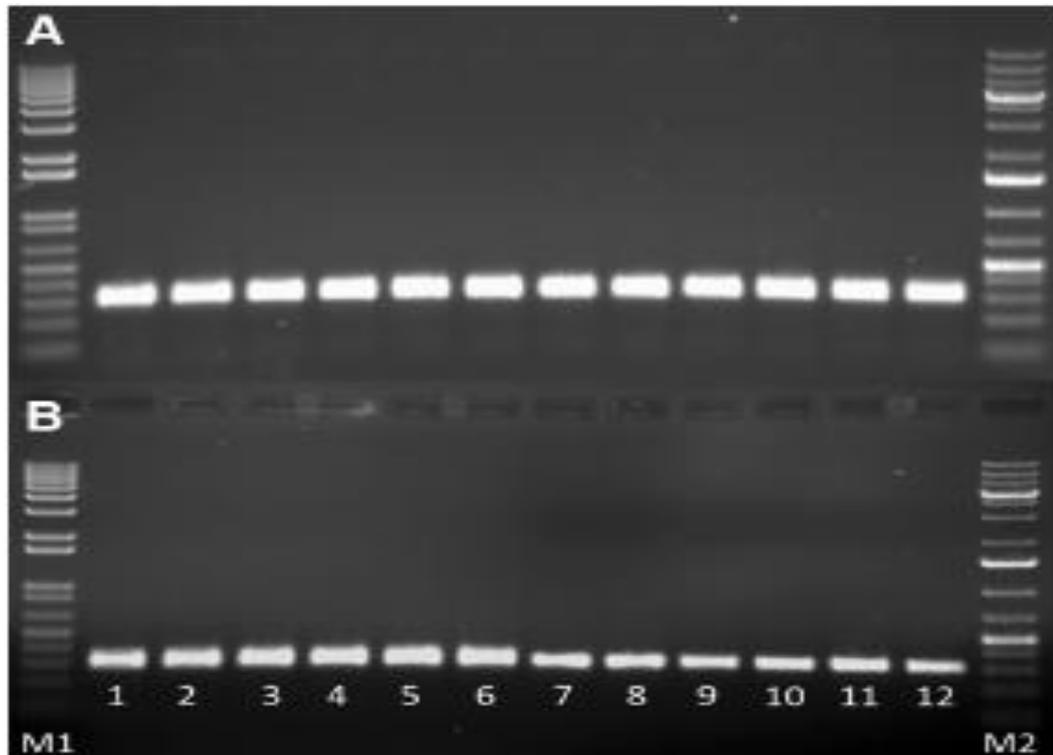


Figure 36 : Comparaison de la récupération de l'ADN à partir du gel entre différentes méthodes (Tzec-Sima *et al.*, 2017).

Note : A) ADN initial, avant purification. B) ADN après purification.

6.5. Séquençage :

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci. Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans plusieurs domaines. Les deux premières techniques de séquençage de l'ADN, celle de Maxam-Gilbert et celle de Sanger ont été décrites en 1977. La technique de Sanger a révolutionné le monde de la biologie moléculaire en permettant de décrypter différents génomes. Bien que les techniques de séquençage évoluent, la méthode de Sanger continue d'être la méthode la plus employée dans le monde à l'heure actuelle. La méthode de Sanger a en effet rapidement dépassé la méthode de Maxam-Gilbert pour la remplacer et reste à ce jour la principale méthode de séquençage utilisée dans les laboratoires. Son principe est comme indiqué (Figure 37) (Lamoril *et al.*, 2008).

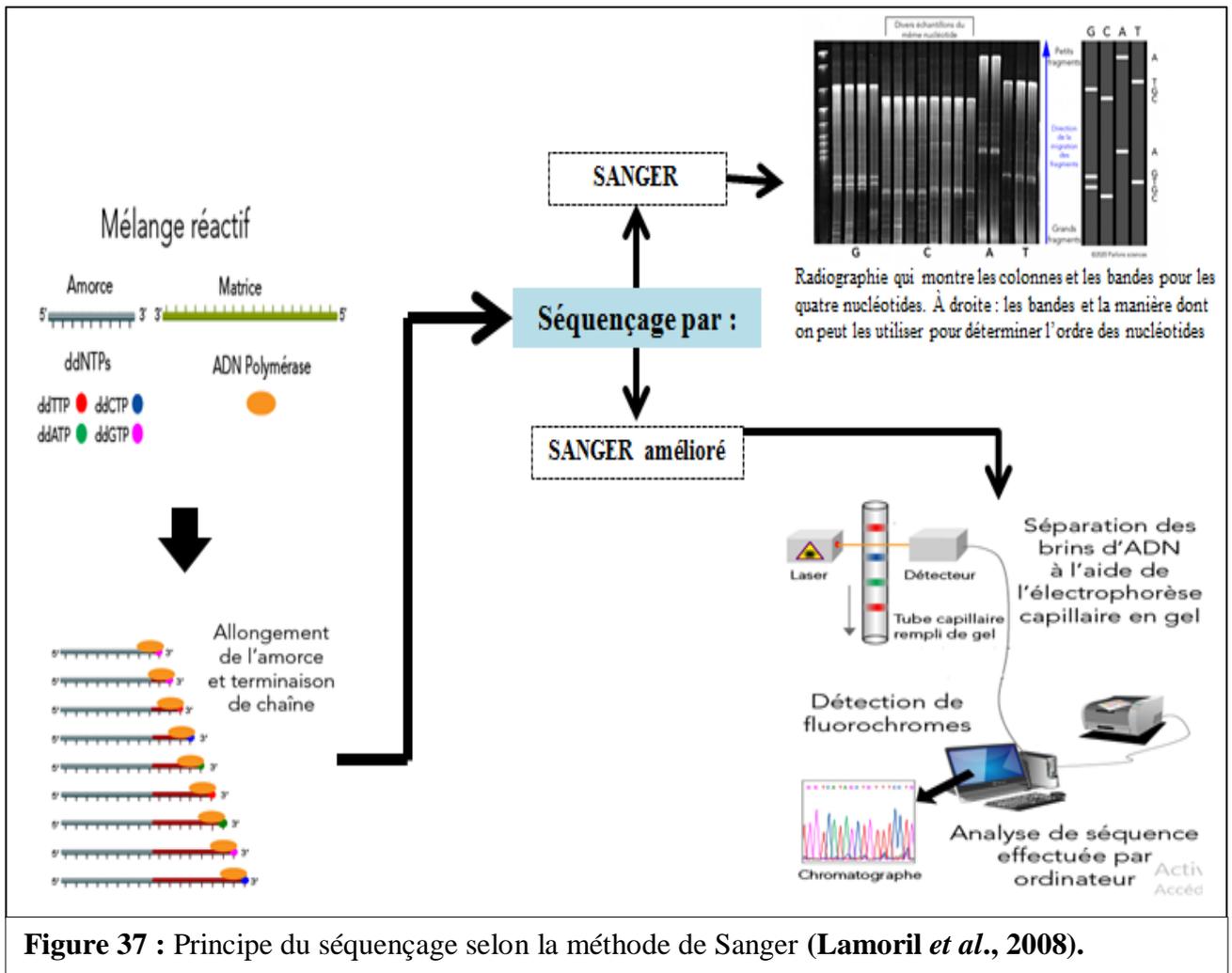


Figure 37 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008).

6.6. Analyse de la séquence d'ADNr 16S et l'arbre phylogénétique :

Il existe deux cas principaux d'analyse de séquence d'ADNr 16S. L'une est une séquence partielle d'ADNr 16S séquencée dans une direction et il n'est pas nécessaire de l'assembler. Un autre type est un contig assemblé par deux séquences qui est toujours produit par clone pour obtenir une séquence d'ADNr 16S presque complète de haute qualité. Deux types de fichiers seront reçus de la société de séquençage, l'un est ab1format et pourrait être ouvert en utilisant Chromas, et un autre est le format Editseq qui pourrait être ouvert en utilisant Editseq, Bioedit ou le bloc-notes (Xiu *et al.*, 2016).

La carte de qualité de la séquence est affichée dans la première et une séquence modifiable est répertoriée dans la dernière. La séquence qualifiée est alignée dans la base de données (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon> et <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> sont généralement utilisés). L'analyse de l'alignement ainsi que la construction d'un arbre phylogénétique seront détaillées plus loin. Le SeqMan dans le paquet DNASTar, le séquenceur ou le vecteur NTI peut être utilisé pour

l'assemblage. Le contig peut être assemblé par SeqMan comme dans les étapes sur annexe 2 (**Xiu et al., 2016**).

Le degré de divergence entre les gènes homologues est considéré comme une mesure de leur parenté. En phylogénie moléculaire, les relations entre organismes, généralement existantes, sont examinées en comparant des séquences d'ADN ou de protéines homologues. Les relations sont affichées sous forme d'arbres phylogénétiques avec des longueurs de branches (ou de bords) reflétant les degrés de divergence génétique. Chaque extrémité de branche représente une séquence existante, les nœuds internes ou sommets représentent des ancêtres inconnus des nœuds terminaux. Le schéma de ramification et les longueurs de ramification décrivent les voies évolutives menant aux séquences au niveau des nœuds terminaux. Les grappes de branches terminales connectées à un ancêtre commun sont appelées clades. Pour préparation d'arbre phylogénétique, il faut utiliser des outils spéciaux dans les domaines de bio-informatique (**Kerstin, 2006**).

Chapitre IV :

Études des substances antimicrobiennes

1. Recherche de l'activité antimicrobienne :

1.1. Choix des microorganismes-cibles :

Les microorganismes-cibles ont été utilisés pour déterminer les activités antagonistes et le spectre d'action des actinobactéries (Toumatia, 2015). La mise en évidence de l'activité antibiotique d'un actinobactéries est réalisée sur des milieux de culture solides par les méthodes des stries croisées, des cylindres d'agar ou de la double couche, contre une série de microorganismes-cibles (champignons, bactéries et levures) (Tableau 14). Certains chercheurs ont développé des screening ciblés par l'utilisation des bactéries résistantes à certains types 22 d'antibiotiques; ex: utilisation de souches résistantes aux aminoglycosides pour la sélection des actinobactéries actifs producteurs d'antibiotiques aminoglycosidiques (Okami et Hotta, 1988).

Tableau 14: Quelques germes cibles pour la recherche d'activité antimicrobienne (Souagui, 2015).

Germes cibles	Espèces
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Bactéries à Gram négatif	<i>Esherichia coli</i> ATCC 25922 ; <i>Vibrio alginolytiucus</i> ATCC 17749; <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ;
Champignons filamenteux et levures	<i>Aspergillus carbonarius</i> A731C <i>Aspergillus niger</i> 2CA936 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 <i>Aspergillus flavus</i> 391B1 <i>Aspergillus flavus</i> 391B3 <i>Aspergillus parasiticus</i> CB5 <i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 3174 <i>Fusarium culmorum</i> INPV <i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium oxysporum</i> INPV <i>Penicillium expansum</i> <i>Fusarium glabrum</i> <i>Fusarium multifarum</i> <i>Fusarium sporotrichoides</i> <i>Candida albicans</i> ATCC 10231

1.2. Recherche de l'activité antibactérienne :

1.1.1. Inocula des bactéries-tests :

L'activité antibactérienne des souches actinobactéries isolées est recherchée contre des bactéries-tests qui sont obtenues auprès de l'American Type culture collection (ATCC) et de l'Hôpital Juntendo, Tokyo Japon. Elles sont constituées de bactéries à coloration de Gram positive et contre des bactéries à coloration de Gram négative (Tableau 14). À partir d'une culture de 18 h sur le

milieu Trypticase soy agar (TSA), une suspension de chaque bactérie test en eau physiologique (0.9% NaCl) est préparée. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0.5 McFarland (une densité optique égale à 0,2 à 650 nm) de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/ml après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (Kitouni, 2007).

1.1.2. Test d'activité :

1.1.2.1 Test d'activité par technique des cylindres d'Agar :

Cette technique sert à mettre en évidence l'activité antimicrobienne par la présence ou non d'une zone d'inhibition, et à quantifier cette activité par la mesure de diamètre de cette zone (en mm). Les souches d'actinobactéries isolées sont ensemencées en stries serrées sur le milieu SCA et incubées à 28°C pendant 7-9 jours. Des cylindres d'agar de 3 mm de diamètre sont ensuite prélevés à l'emporte-pièce et déposés à la surface du milieu de Mueller-Hinton (Merck) préalablement ensemencé par les bactéries-tests (Figure 38). Les boîtes sont alors placées à 4°C pendant 4 heures, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres sont alors mesurés (Kitouni, 2007 ; Souagui, 2015).

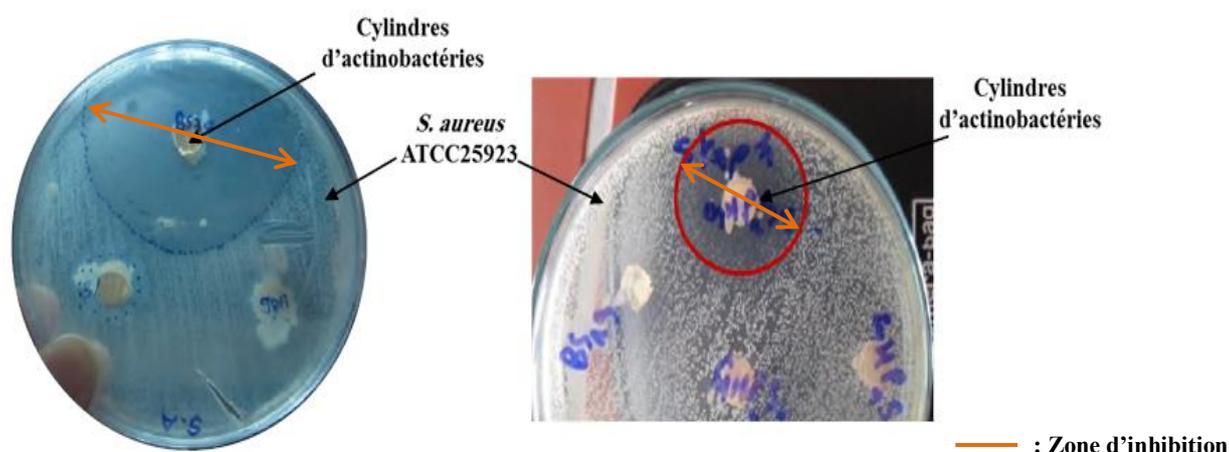


Figure 38. Activité antibactérienne des cylindres d'actinobactéries vis-à-vis de *S. aureus* ATCC25923 (Souagui, 2015).

1.1.2.2. Test d'activité par la méthode de stries croisées :

Cette méthode consiste à ensemencer la souche d'actinobactérie en un seul trait à la surface du milieu solide ISP2 et en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation de l'actinobactérie pendant 10 jours à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, les microorganismes cibles sont ensemencés perpendiculairement à la strie longitudinale de la souche d'actinobactérie (Figure 39). La lecture des résultats se fait par la mesure

du diamètre d'inhibition entre la bordure de l'actinobactérie et la souche cible, après 24 h d'incubation pour les bactéries (Figure 40) (Harir, 2018).

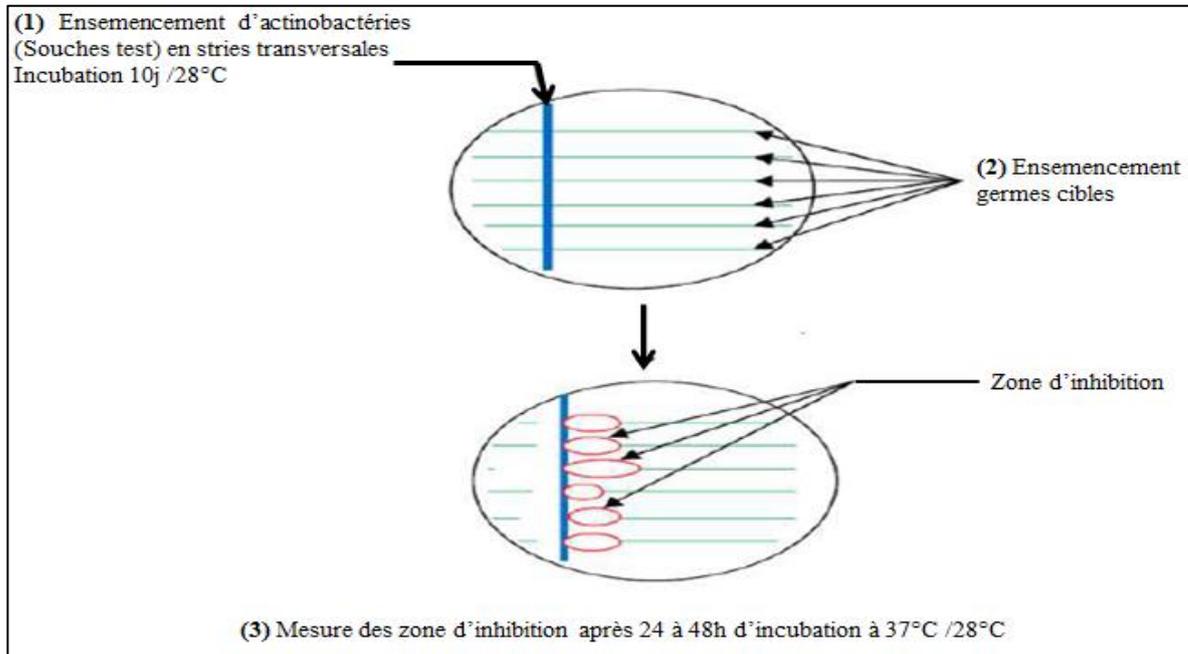


Figure 39 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide par la méthode des stries croisées (Boubetra *et al*, 2013).

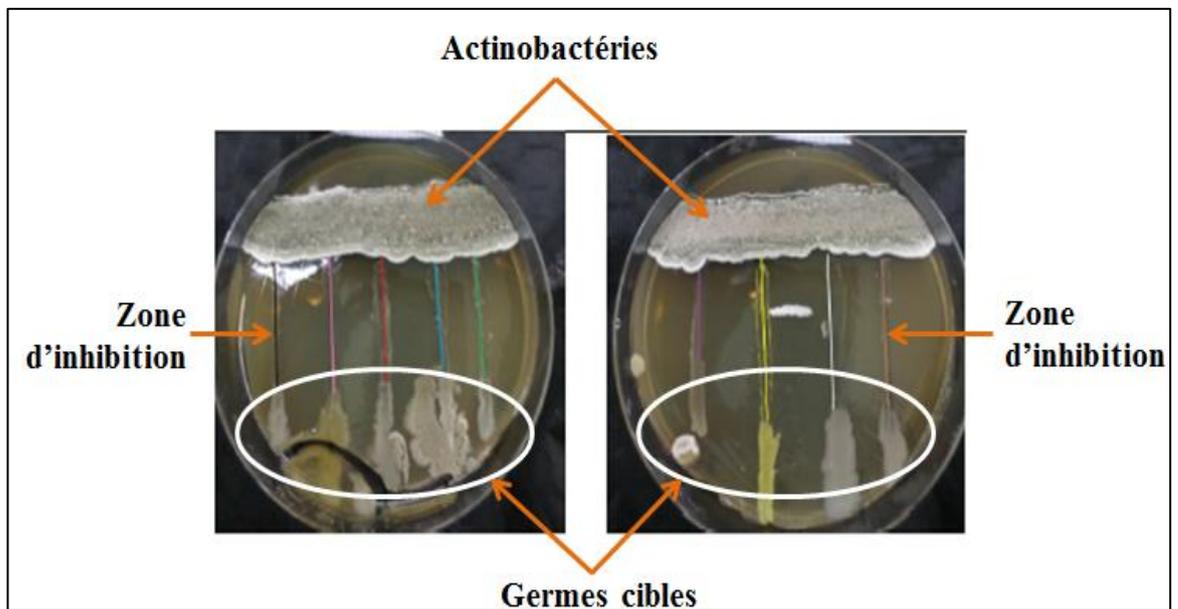


Figure 40 : Résultats de l'activité antimicrobienne par la méthode de stries croisées d'actinobactéries isolé vis-à-vis des bactéries Gram (+) et Gram (-) (Harir, 2018).

1.3. Recherche de l'activité antifongique :

1.3.1. Inocula de germes cibles :

L'activité antifongique des actinobactéries isolés est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar contre les champignons filamenteux obtenus de l'ATCC et de la collection d'UMIP. Les champignons filamenteux sont repiqués sur milieu à l'extrait de malt et incubés à 28°C pendant 14 à 21 jours. Une suspension dense de spores et de fragments mycéliens est obtenue par raclage des cultures après addition d'eau physiologique (0.9% NaCl). La suspension est diluée jusqu'à atteindre une absorbance de 0.20 à 650 nm. Cette suspension diluée au 1/10^e servira d'inoculum calibré. L'activité antifongique a été recherchée contre les champignons filamenteux et levures (Tableau 14) (Souagui, 2015).

1.3.2. Test d'activité :

1.3.2.1. Test d'activité par technique des cylindres d'Agar :

L'activité antifongique des isolats a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu YMA (Lemriss *et al.*, 2003). La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 heures d'incubation à 28°C pour les levures et après 48 heures pour les champignons filamenteux (Figure 41).

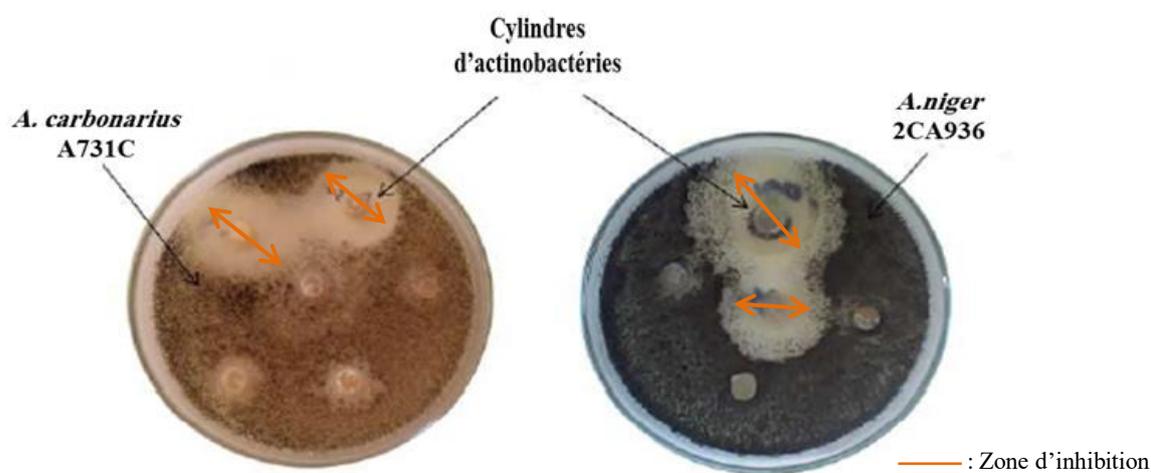
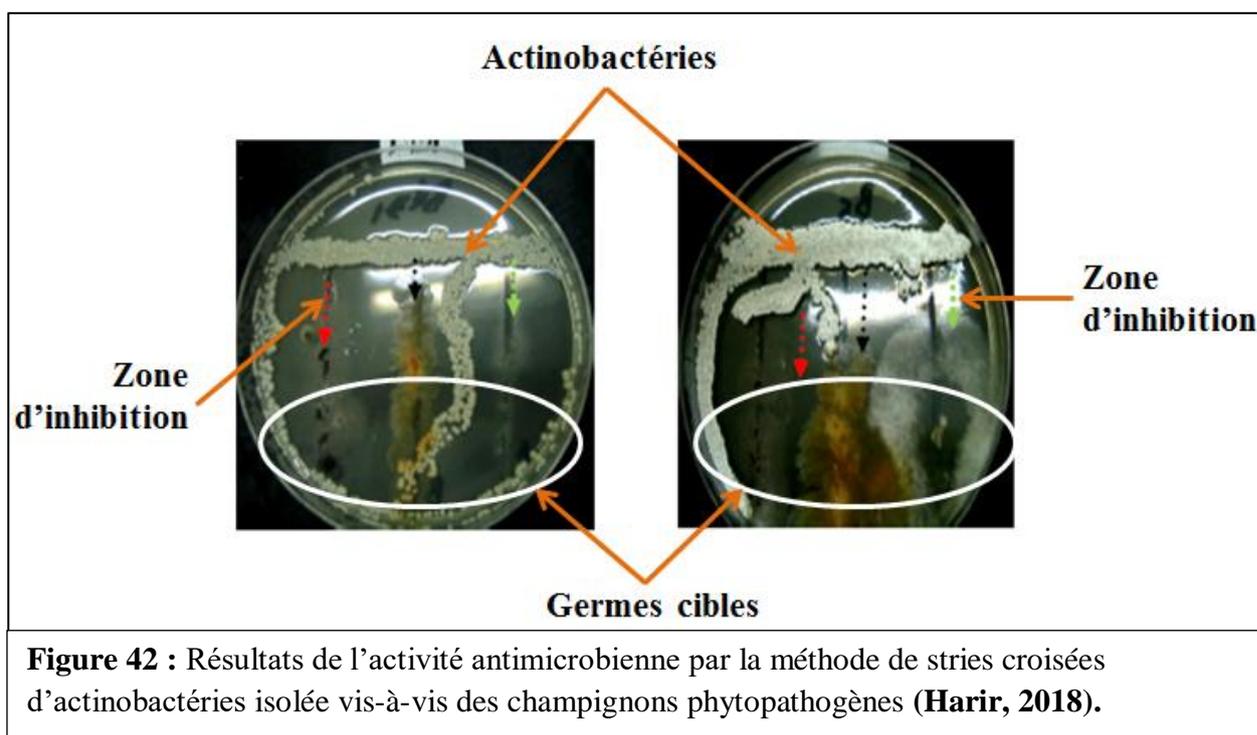


Figure 41 : Activité antifongique des cylindres d'actinobactéries vis-à-vis de *A. carbonarius* A731C et *A. niger* 2CA936 (Souagui, 2015).

1.3.2.2. Test d'activité par Méthode de stries croisées :

Ensemencer la souche d'actinobactérie en un seul trait à la surface du milieu solide ISP2 et en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation de l'actinobactérie pendant 10 jours à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, les microorganismes cibles sont ensemencés perpendiculairement à la strie longitudinale de la souche d'actinobactérie. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition entre la bordure de l'actinobactérie et la souche cible, après 48h et 72h respectivement pour les levures et les champignons (Figure 42) (Harir, 2018).



2. Productions d'antibiotiques :

Les principaux facteurs influençant la production d'antibiotiques sont les besoins nutritionnels et les conditions de culture. L'optimisation des conditions pour la production des antibiotiques est indispensable et cela nécessite une bonne connaissance de différents paramètres de culture tels que : l'inoculum, la composition du milieu de culture et un système de fermentation approprié (Souagui, 2015).

2.1. Préparation de l'inoculum

Des tubes contenant le milieu ISP3 gélosé incliné sont ensemencés par les souches d'actinobactéries isolées et purifiées puis incubées pendant 21 jours à 28°C . La surface des colonies est raclée et une suspension dense de fragments mycéliens et de spores est préparée en eau physiologique stérile, celle-ci constitue l'inoculum. Pour chaque souche, l'inoculum est préparé de

telle manière à obtenir une densité optique égale à 0,1 pour une longueur d'onde de 660 nm (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

2.2. Production d'antibiotique par les techniques de fermentation

Les conditions et les milieux de fermentation doivent être optimisés pour chaque souche actinobactérienne pour la production de produits souhaitables (**Balagurunathan et al., 2020**).

2.2.1. Fermentation solide :

La fermentation solide (fermentation de substrats solides, fermentation humide, culture solide, etc. et en anglais : solid-state fermentation ou SSF) est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (**Rahardjo et al., 2006**). Il y a plusieurs aspects importants, qui devraient être considérés en général pour le développement de tout bio-processeur dans SSF. Il s'agit notamment de la sélection du micro-organisme et du substrat appropriés, de l'optimisation des paramètres du procédé et de l'isolement et de la purification du produit (**Pandey, 2012**).

➤ Méthode de fermentation solide :

Les organismes filamenteux préfèrent généralement les constituants solides du sol pour s'ancrer, se développer et aussi pour produire des métabolites secondaires. Pendant l'incubation, les champignons et les actinobactéries sécrètent des métabolites secondaires extracellulaires dans le milieu environnant (Figure 43) (**Balagurunathan et al., 2020**).

2.2.2. Fermentation liquide :

La fermentation effectuée en présence d'un excès d'eau libre est appelée fermentation submergée (Submerged fermentation en anglais) (**Singhania et al., 2015**). Elle implique la croissance du micro-organisme sous forme de suspension dans un milieu liquide (**Fahmia et al., 2019**). C'est une méthode utilisée principalement pour produire des antibiotiques et d'autres produits (Martínez-Medina et al., 2019). Dans cette fermentation, les éléments importants sont l'organisme lui-même, le milieu, la stérilisation et les facteurs environnementaux (**Knight et al., 2003**).

➤ Méthode de fermentation liquide :

Le processus implique la croissance d'un micro-organisme spécifique tel que des bactéries, des champignons et des actinobactéries dans un petit ballon fermé contenant un bouillon de fermentation nutritif (**Balagurunathan et al., 2020**), pouvant contenir environ 50 g/L de solutés, avec une teneur en eau de 95%. Ce système de fermentation permet d'obtenir une grande variété de produits à partir de micro-organismes plus divers, car il offre un meilleur contrôle du processus et utilise des milieux de culture bien définis, garantissant une bonne reproductibilité (**Martínez-Medina et al., 2019**) (Figure 43).

Finalement, le tableau 15 représente une globale comparaison entre la fermentation solide et liquide.

Tableau 15 : Comparaison entre la fermentation solide et liquide (Manpreet *et al.*, 2005)

Fermentation solide (SSF)	Fermentation liquide (SMF)
Les organismes nécessitant moins d'eau pour la croissance sont préférés comme les microorganismes filamenteux.	La concentration du milieu est bien inférieure à la teneur en eau.
Support inerte (naturel ou artificiel), contenant tous les composants pour la croissance sous forme de solution.	Les ingrédients transformés requis sont chers.
Moins de risques de contamination en raison de la faible disponibilité de l'eau.	L'activité plus élevée de l'eau devient la principale cause de contamination dans les smf.
Moins de consommation d'énergie pour l'aération et le transfert de gaz.	Une pression d'air élevée consomme plus d'énergie et le transfert de gaz dans le smf est médiocre
Le facteur limitant de la croissance est la diffusion des nutriments.	Un mélange vigoureux facilite la diffusion.
Beaucoup de difficultés pour mesurer la quantité de biomasse présente et d'autres processus en ligne.	Des capteurs en ligne sont disponibles et l'échantillonnage est facile pour la mesure de la biomasse.
Le traitement en aval est facile, moins coûteux et prend moins de temps.	L'eau rend le processus en aval difficile et très coûteux.

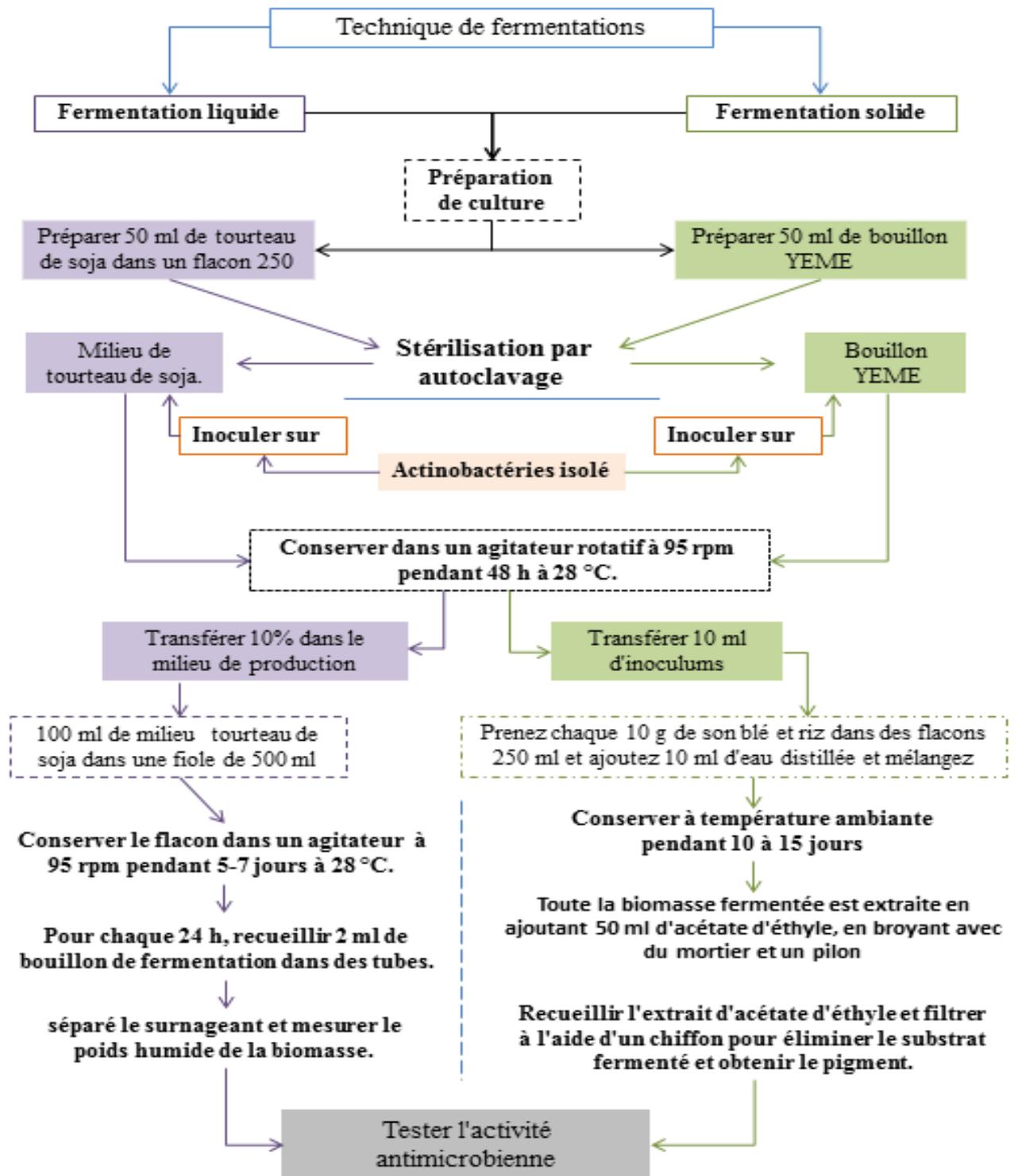


Figure 43: Techniques utilisées pour les fermentations liquides et solides. (Balagurunathan *et al.*, 2020).

2.3. Cinétiques de production des antibiotiques :

Les cinétiques de production des antibiotiques sont suivies sur 10 jours en vue de déterminer le temps de production optimale et le meilleur milieu de production dans des conditions déterminées ainsi que le suivi de quelques paramètres de culture tel que le pH et la biomasse. Des prélèvements quotidiens sont effectués afin de mesurer la production d'antibiotiques par antibiographie. La technique utilisée est celle des puits de diffusion dans l'agar. Les tests sont effectués sur des germes cibles parmi eux sont multirésistants aux antibiotiques (**Aouiche, 2013**).

Mesure du poids sec pendant 10 jours. Pour cela 2 mL de culture sont prélevés dans un tube sec et centrifugés à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est recueilli pour la mesure du pH et le culot mycélien est lavé deux fois à l'eau distillée. Après séchage dans un four à 105°C pendant 24 h, le tube est re-pesé et le poids sec est calculé. L'expérience est réalisée en double et la moyenne entre les deux valeurs de chaque essai représente la valeur finale du poids sec (**Aouiche, 2013**).

2.4. Conditions optimales de la fermentation :

Les conditions optimales pour la biosynthèse des métabolites secondaires ne sont pas nécessairement identiques à ceux de la croissance. En général, les zones optimales sont plus étroites pour la production du métabolisme secondaire, elles varient d'un microbe à l'autre (**Knight et al., 2003**).

Les températures optimales pour la production de métabolites secondaires sont généralement inférieures à celles de la croissance, mais peuvent varier considérablement. Par exemple, une température optimale de 21 °C est requise pour la production de la cyclosporine par *Tolypocladium inflatum*, 25 °C pour la synthèse de streptomycine par *S. griseus* ou 28 °C pour la production de la nébulmycine par *Streptomyces tenebrarius*. Le temps d'incubation est un autre point clé et dépend des caractéristiques de croissance du micro-organisme et des conditions de culture. Par exemple, la production chez les actinobactéries peut varier de 3 jours pour la production maximale d'arylomycines par une souche de *Streptomyces* à 12 jours pour la production maximale de pramicidine S par une souche d'*Actinomadura* (**Knight et al., 2003**).

Ainsi, un programme de fermentation systématique devrait être conduit avec des souches «compétentes» afin de maximiser le nombre de composés produits par chaque souche. Une telle approche devrait inclure:

- ❖ Cultures cultivées dans des récipients liquides agités et sur des milieux solides ;
- ❖ Cultures cultivées avec des milieux de composition différente ;
- ❖ Incubation à deux températures ou plus ;
- ❖ Incubation pendant au moins deux périodes différentes ;
- ❖ Milieu ayant au moins deux niveaux de pH (**Zhang, 2005**).

3. Méthodes d'extraction et purification :

3.1. Extraction des antibiotiques :

3.1.1. Extraction à partir du filtrat de culture :

Chaque souche d'actinobactéries est ensemencée dans deux Erlenmeyers de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu liquide ISP2 (Tableau 16). Au jour optimal de production d'antibiotiques (déterminé précédemment lors des cinétiques), les filtrats sont répartis en 4 fractions de 50 mL extraites chacune avec 50 mL de solvant. Pour cela, quatre solvants organiques non miscibles à l'eau et de polarité croissante sont testés (Tableau 16). Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses, puis déshydratées par passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) contenant du sulfate de sodium anhydre (Tableau 16) afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles présents (Aouiche, 2013). Puis évaporées à 40°C. Les résidus secs sont repris dans un minimum de méthanol puis testés par antibiographie. Cette expérience nous permettra de choisir le meilleur solvant d'extraction afin de poursuivre les travaux sur des quantités de culture plus importantes (Badji, 2006) (Figure 44).

Tableau 16 : Les conditions pour l'extraction à partir du filtrat de culture (Aouiche, 2013).

Milieu ISP 2	PH = 7,2 Agitation = 250 rpm Température = 30°C
Solvants organiques	Le <i>n</i> -hexane Le dichlorométhane Le <i>n</i> -butanol L'acétate d'éthyle
Compositions de filtre (W n°1)	Entonnoir Papier filtre 2 g de sulfate de sodium

3.1.2. Extraction à partir du mycélium :

L'extraction des antibiotiques à partir du mycélium est effectuée selon la méthode de Mechlinski (1978). Après centrifugation des cultures de chaque souche d'actinobactéries, le mycélium est recueilli, lavé plusieurs fois à l'eau distillée (Aouiche, 2013). Le culot mycélien est extrait par agitation dans du méthanol pendant 2 h à température ambiante. L'extrait méthanolique est filtré puis testé par antibiographie par la méthode des disques en papier (Driche, 2010) (Figure 44).

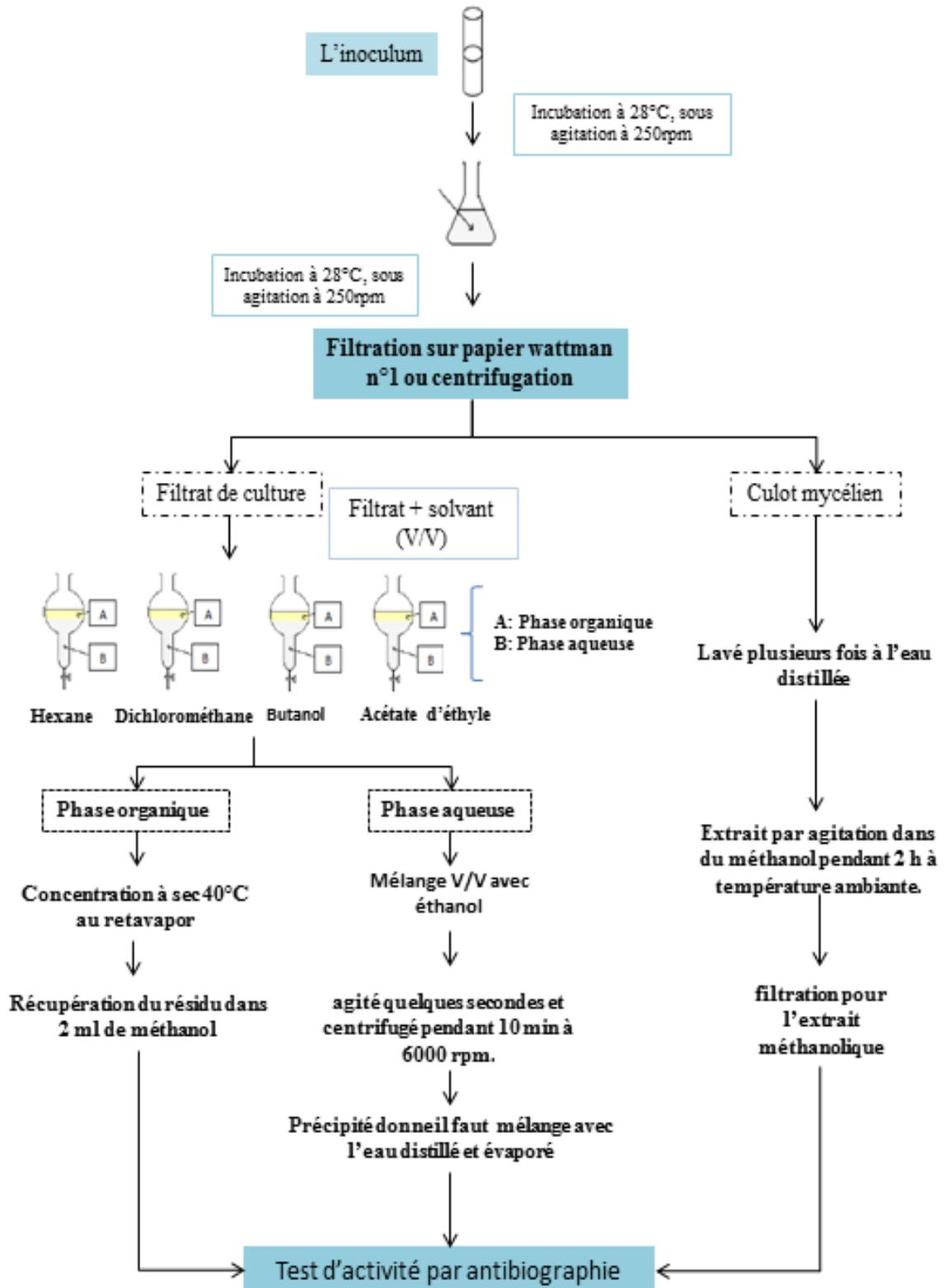


Figure 44 : Protocole d'extraction d'antibiotique (Aouiche, 2013).

3.2. Anti-biographie :

Pour sélectionner le meilleur solvant d'extraction des antibiotiques, les extraits obtenus à partir des filtrats de culture et du mycélium sont testés contre les microorganismes cibles choisis. Des disques en papier de 6 mm de diamètre (Institut Pasteur, Paris) sont imbibés par 25 μL d'extrait organique, puis séchés totalement à froid à l'aide d'un séchoir. Les disques sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45 min avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu ISP2 (12 g/L d'agar), préalablementensemencé par le microorganisme-cible. Les boîtes sont ensuite mises 2 h à 4°C pour permettre une bonne diffusion des produits actifs, puis incubées à 30°C. Des disques témoins imbibés par les solvants utilisés lors de l'extraction et séchés dans les mêmes conditions il faut les tester pour confirmer qu'il n'y a pas une activité antimicrobiens. La phase aqueuse est également testée par antibiographie (même conditions) pour estimer l'activité résiduelle non extraite (Aouiche, 2013) (Figure 45).

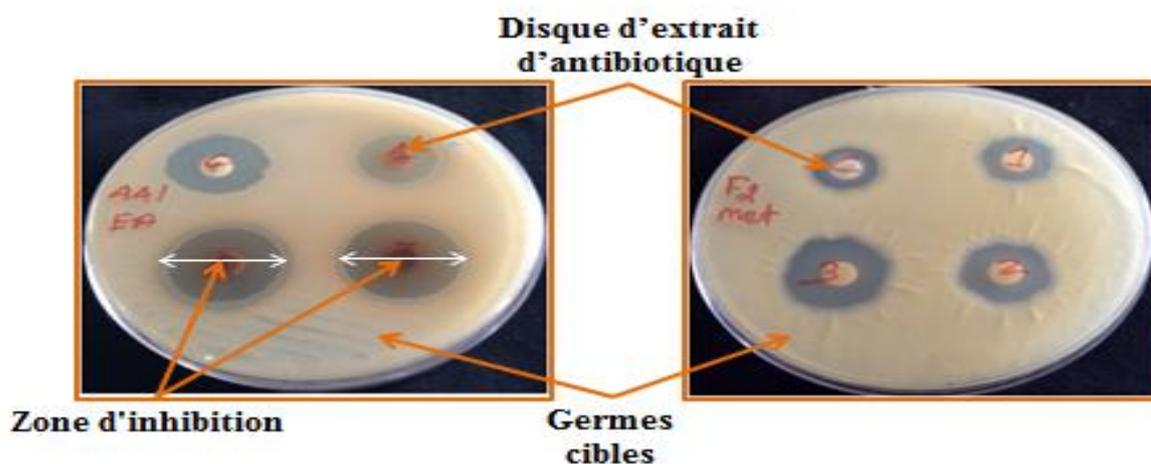


Figure 45 : Test d'activité par technique d'anti-biographie (Ganesan *et al.*, 2016)

3.3. Purification des antibiotiques :

3.3.1. Purification par chromatographie sur couche mince (CCM) :

Cette méthode très simple à mettre en œuvre, de faible coût et rapide permet au niveau des lieux d'arrivage des médicaments d'effectuer un contrôle même si ce lieu ne bénéficie pas de laboratoire d'analyse et de personnes qualifiées pour effectuer des analyses. On peut ainsi traiter un grand nombre d'échantillons et obtenir des résultats fiables (Ranger, 2015).

D'une méthode de chromatographie plane dont la phase mobile est un liquide. Elle permet de séparer les composés ou les purifier. Son mode de fonctionnement est simple. Une plaque de CCM est un support en verre ou en aluminium recouvert sur une face par une phase stationnaire en couche uniforme. Cette phase stationnaire est en général de la silice. Il est possible d'y intégrer un agent de

fluorescence pour permettre une lecture en Ultraviolet si les composés de l'échantillon ne sont pas colorés (Ranger, 2015) (Figure 46).

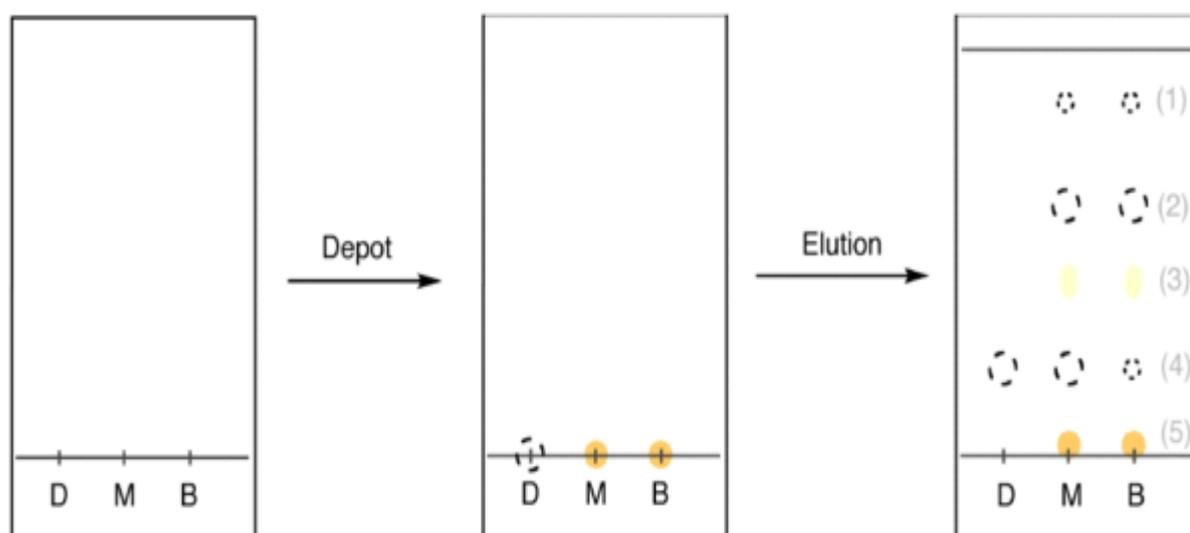


Figure 46: Illustration du fonctionnement d'une CCM (Ranger, 2015).

Note: D, M et B: des extraits

La CCM est donc une méthode rapide (1 à 2h), simple à exécuter, de faible coût et présentant une sensibilité de l'ordre du microgramme. Elle permet de déterminer la pureté d'un médicament (Ranger, 2015).

En 1946, Goodalland Levi a combiné la méthode de chromatographie sur papier (PC) avec la bioautographie de contact pour détecter différentes antimicrobiennes pour leur détermination. Là après, Fischer et Lautner ont introduit la CCM dans le même domaine (Balouiri *et al.*, 2016). Cette technique combine la CCM avec des méthodes de détection biologiques et chimiques. Plusieurs travaux ont été réalisés sur le criblage d'extraits organiques, principalement d'extraits de plantes, pour l'activité antibactérienne et antifongique par CCM-bioautographie (Mehrabani *et al.*, 2013). Comme indiqué ci-dessous, deux techniques bioautographiques.

3.3.1.1. Gélose diffusion :

Également connue sous le nom de méthode de contact avec la gélose, c'est la moins utilisée des techniques. Il s'agit du transfert par diffusion de l'agent antimicrobien du chromatogramme (PC ou CCM) vers une plaque de gélose préalablement inoculée avec le microorganisme testé. Après quelques minutes ou heures pour permettre la diffusion, le chromatogramme est retiré et la plaque de gélose est incubée. Les zones d'inhibition de la croissance apparaissent dans les endroits où les composés antimicrobiens entrent en contact avec la couche de gélose (Marston, 2011).

3.3.1.2. Bioautographie :

La bioautographie directe est la méthode la plus appliquée parmi ces trois méthodes. La plaque de CCM développée est trempée ou pulvérisée avec une suspension microbienne. Ensuite, le bioautogramme est incubé à 25 °C pendant 48h dans des conditions humides (**Dewanjee et al., 2015**). Pour la visualisation de la croissance microbienne, les sels de tétrazolium sont fréquemment utilisés. Ces sels subissent une conversion en mazan intensément coloré correspondant par les déshydrogénases des cellules vivantes (**Grzelak, 2011**). Le violet d'Iodonitrotétrazolium est le réactif de détection le plus approprié (**Marston, 2011**). Ces sels sont pulvérisés sur le bioautogramme, qui est ré-incubé à 25 °C pendant 24h ou à 37 °C pendant 3-4 h (**Balouiri et al., 2016**). Le bouillon Mueller Hinton additionné de gélose a été recommandé pour donner un milieu suffisamment fluide pour permettre une meilleure adhérence à la plaque de CCM et maintenir une humidité appropriée pour la croissance bactérienne (**Balouiri et al., 2016**).

La bioautographie directe peut être utilisée avec des champignons ou des bactéries (**Balouiri et al., 2016**) (Figure 47).

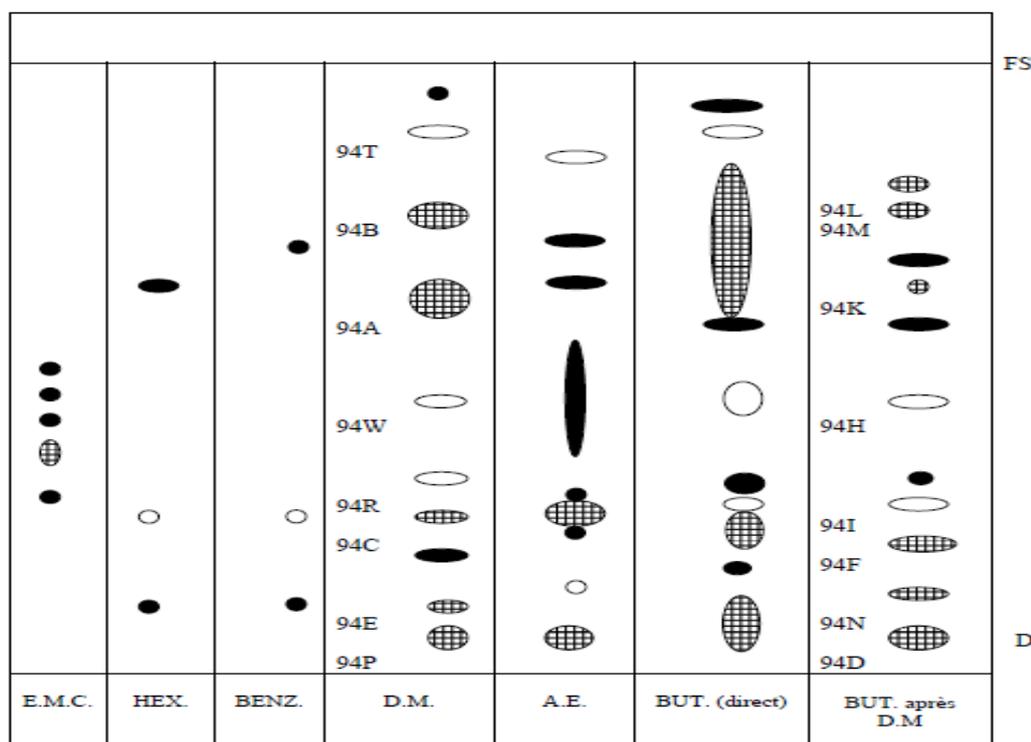


Figure 47 : Localisation des activités par bioautographie des extraits organiques des cellules et du filtrat de culture et du mycélium d'actinobactéries (**Badji, 2006**).

Note : AM., solvant de migration: acétate d'éthyle-méthanol (100-15 v/v); FS, front de migration du solvant; D, dépôt; Rf, rapport frontal; EMC, extrait méthanolique des cellules; HEX, hexane; BEN, benzène; D.M., dichlorométhane; A.E, acétate d'éthyle; BUT, *n*-butanol.

3.3.2. Purification par chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne a été réalisée pour la séparation du composé actif de l'extrait brut d'actinobactéries de la production (Shetty *et al.*, 2014). L'extrait brut Peut-être purifié à l'aide de méthodes chromatographiques. Parmi ces méthodes, la chromatographie sur colonne est le plus souvent appliquée. Sur une colonne (phase stationnaire) on applique d'abord l'échantillon à séparer, puis le tampon de lavage (phase mobile) (Figure 48) (Coskun, 2016). Leur écoulement à travers le matériau intérieur de la colonne placé sur un support en fibre de verre est assuré. Les échantillons sont accumulés au fond de l'appareil et dépendante du volume (Das et Dasgupta, 1998).

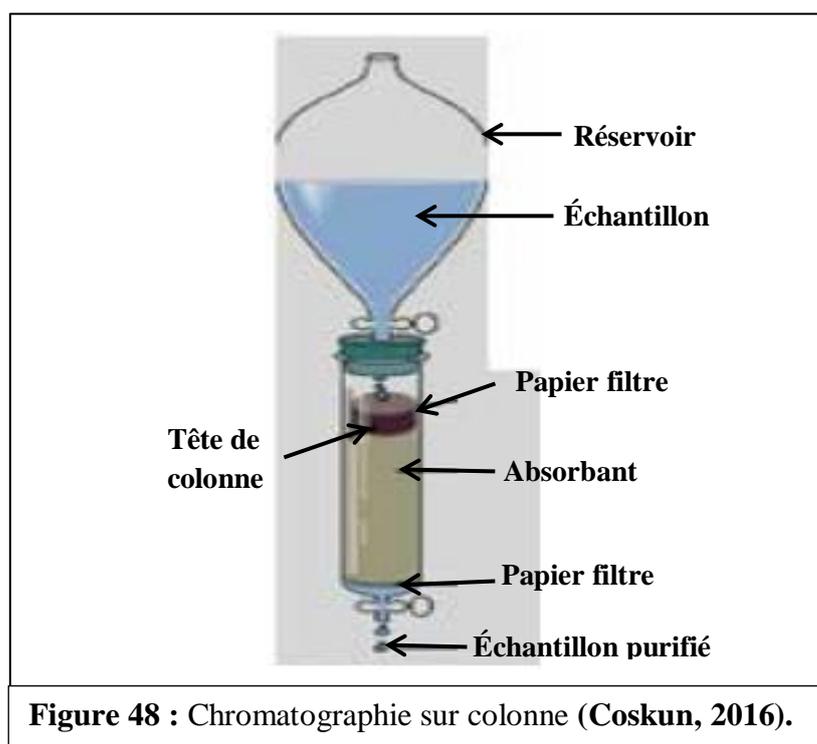


Figure 48 : Chromatographie sur colonne (Coskun, 2016).

3.3.3. Purification par HPLC (High-pressure liquid chromatography) :

La Chromatographie Liquide Haute Performance, appelée du nom de son abréviation HPLC, est une technique de séparation universelle, avec pour seule exigence la solubilité de l'échantillon dans la phase liquide mobile. Il s'agit du même principe que la chromatographie classique sur colonne, mais en raison de l'utilisation de la phase solide stationnaire finement divisée dans la colonne, une haute pression s'exerçant sur la phase mobile est nécessaire pour vaincre la perte de charge assurant ainsi le débit de la phase mobile, donc la réduction du temps d'éluion (Nguyen, 2007).

En utilisant cette technique de chromatographie, il est possible d'effectuer une analyse structurale et fonctionnelle et une purification de nombreuses molécules en peu de temps, Cette technique donne des résultats parfaits dans la séparation et l'identification des acides aminés, des glucides, des lipides, des acides nucléiques, des protéines, des stéroïdes et d'autres molécules biologiquement actives (Coskun, 2016). La séparation des produits est fondée sur plusieurs phénomènes : partage, adsorption, échange d'ions et exclusion. La phase stationnaire utilisée est constituée de groupements C18 greffés sur un support de silice (Rouessac, 1994).

3.3.3.1. Description du système :

La chaîne HPLC est constituée de divers éléments schématisés ci-après sur la figure 49

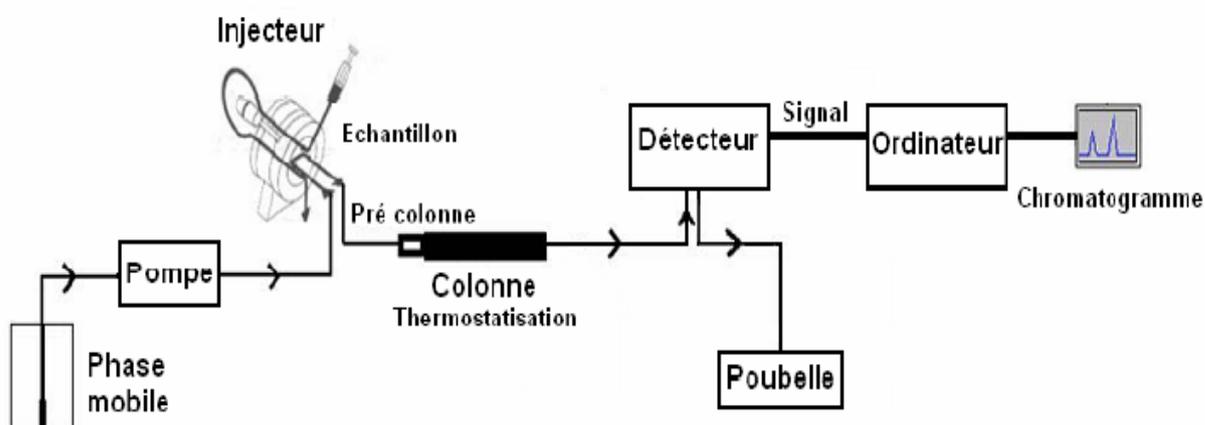


Figure 49 : Schéma d'une chaîne HPLC (Nguyen, 2007).

La phase mobile alimente le chromatographe en permanence : elle est délivrée par une pompe dont le débit est modulable. Les composés à séparer, dissous préalablement dans un solvant, sont prélevés à l'aide d'une seringue puis injectés au niveau d'un injecteur équipé d'une boucle d'injection. Les molécules sont entraînées par la phase mobile vers la colonne chromatographique contenant la phase stationnaire. L'affinité des composés pour la phase stationnaire déterminera leur temps de rétention. Un détecteur fluorimétrique à la sortie de la colonne suit en permanence le passage des composés séparés. Les signaux enregistrés, lors de passage en fonction du temps, traités par ordinateur, sont donnés sous forme d'un chromatogramme (Figure 50). Une bonne séparation se traduira par un pic ou signal isolé, fin et symétrique spécifique à chaque composé dont la surface déterminée par un intégrateur, est fonction de sa concentration (Nguyen, 2007).

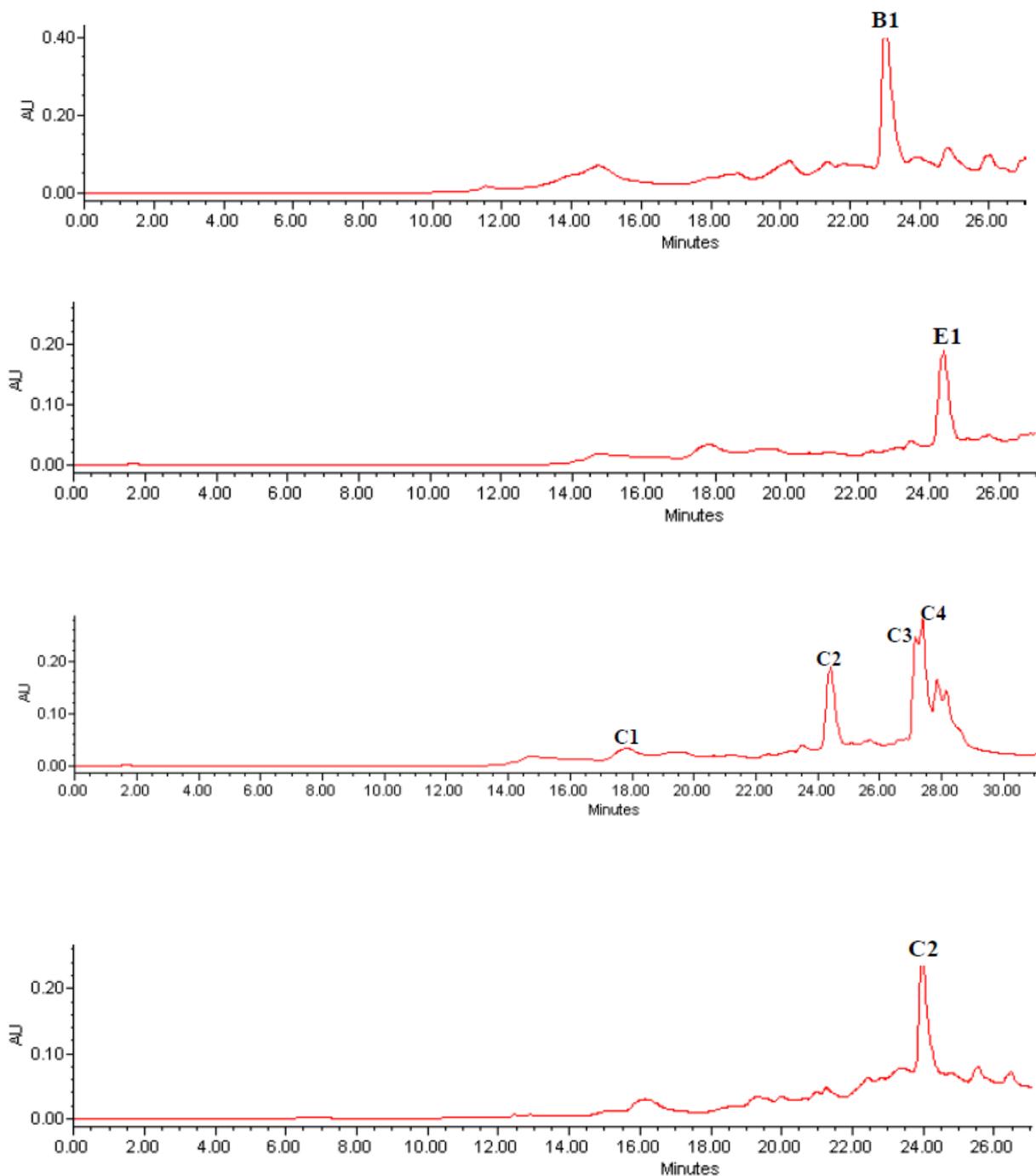


Figure 50 : Résultats des composants purifiés sous forme chromatogramme (Meklat, 2012).

Note : (B1, E1 et C1, 2.... ect) = des fractions d'analyse moléculaire

4. Identification des antibiotiques par méthodes spectrales :

4.1. Spectroscopie en UV-visible :

4.1.1. Principe :

La spectrophotométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie qui met en jeu des photons dont les longueurs d'onde sont comprises dans le domaine du visible et de l'ultraviolet (400-750nm et 100-400nm respectivement). Elle permet une analyse qualitative et quantitative d'une substance en solution (**Binson, 2017**).

Certaines molécules possèdent la particularité d'absorber les photons à ces longueurs d'onde et la spectrophotométrie UV se base sur l'étude de ces propriétés. La spectrophotométrie UV repose sur l'étude de cette absorption en exploitant la loi d'absorption de la lumière, également appelée loi de Beer-Lambert. Lorsqu'un rayonnement I_0 est projeté sur une substance, une partie sera absorbée et une autre partie sera transmise, c'est le rayonnement I (Figure 51) (**Binson, 2017**).

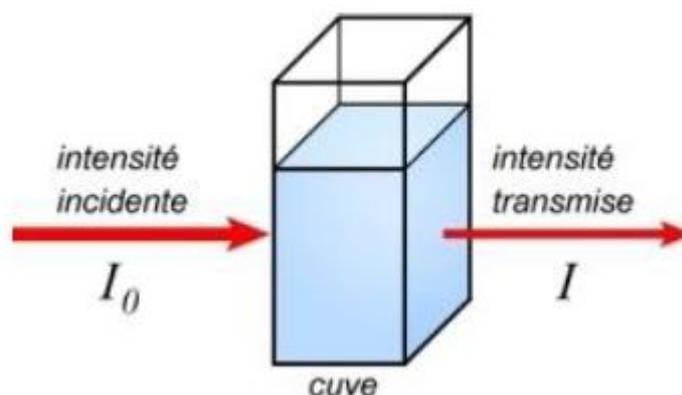


Figure 51 : Principe de la spectrophotométrie UV (**Binson, 2017**).

4.1.2. Application :

Le spectre UV-visible est déterminé en premier lieu sur les extraits butanoliques bruts, pour noter la présence ou non de polyènes (extractibles par le n-butanol), les composés aromatiques et les systèmes insaturés. Par la suite, le spectre est déterminé pour l'antibiotique purifié (**Toumatia, 2015**).

Les spectres UV-visible (produits dissous dans du méthanol) ont été enregistrés sur un spectrophotomètre en utilisant une cuve en quartz de 0,5 cm de trajet optique. Le balayage spectral a été effectué entre 200 et 500 nm (**Toumatia, 2015**).

4.2. Spectroscopie dans l'infrarouge (IR) :

4.2.1. Principe :

Le principe de la spectroscopie infrarouge a été souvent détaillé notamment par Bertrand et par Rouessac (Keirsse, 2003). Le rayonnement infrarouge (IR) est une radiation de nature électromagnétique, correspondant à la partie du spectre comprise entre $12\ 800\text{ cm}^{-1}$ et 10 cm^{-1} . La fenêtre spectrale de l'IR, se décompose en 3 parties : le proche, le moyen et le lointain IR. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la région du moyen infrarouge (MIR), qui s'étend de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} ($2,5\ \mu\text{m}$ à $25\ \mu\text{m}$). Ce domaine correspond aux transitions moléculaires de type vibration et rotation, lesquelles conduiront à des absorptions (Keirsse, 2003).

Lorsqu'une molécule est irradiée par un rayonnement IR, elle peut absorber partiellement et sélectivement ce rayonnement. Les liaisons chimiques qui la composent doivent être considérées comme des oscillateurs anharmoniques (Figure 52), car une liaison n'est pas parfaitement élastique (Keirsse, 2003).

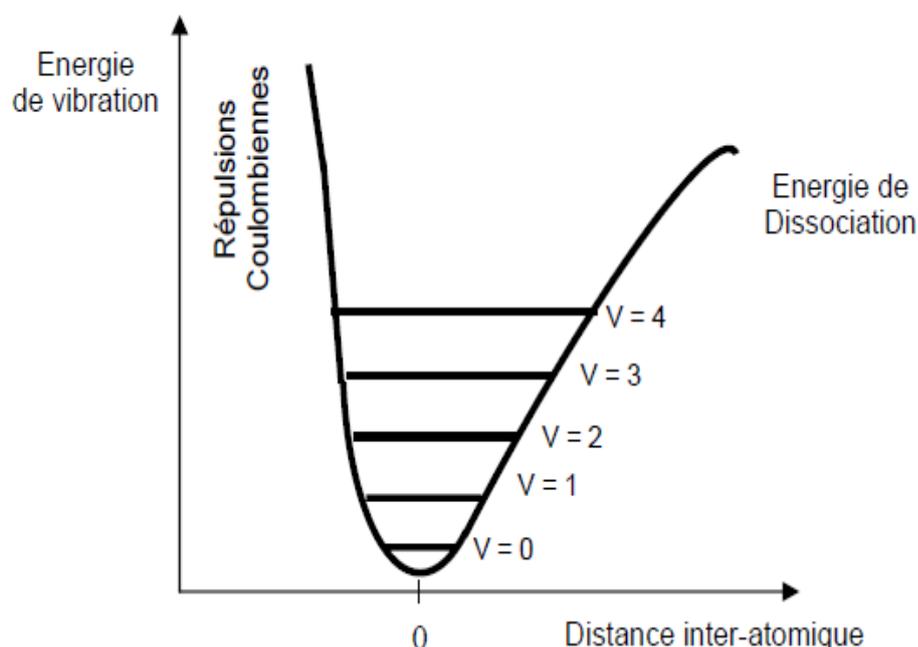


Figure 52 : Potentiel anharmonique et niveaux d'énergie (Keirsse, 2003).

Note : V = Les niveaux d'énergie de vibration

Si une liaison oscille à la même fréquence que la composante électrique de l'onde lumineuse IR, celle-ci pourra transmettre son énergie à la liaison. Plus précisément, un rayonnement de fréquence donnée pourra être absorbé ce qui conduira à l'état excité, caractérisé par une amplitude de vibration plus élevée. De ce fait, l'énergie du rayonnement IR se retrouve diminuée après l'interaction,

conduisant à l'apparition d'une bande d'absorption à cette fréquence. L'énergie absorbée (ν_0) est donc caractéristique de chacune des liaisons chimiques de la molécule analysée. Notons que s'il n'y a pas de dipôle permanent, c'est-à-dire si les charges électriques sont parfaitement symétriques, il n'y aura pas de couplage possible avec l'onde électromagnétique. Il n'y aura donc aucune absorption d'énergie. Les molécules non polaires sont « transparentes » dans l'IR, on parle de transition inactive. Une transition active possède donc nécessairement un dipôle dont le module fluctue avec la distance inter-atomique (Keirsse, 2003).

4.2.2. Application :

Elle permet de déterminer la présence de groupements et fonctions caractéristiques (CH_3 , CH_2 , CH , OH , NH_2 , NH , CHO , COOH , etc.), et d'aromatiques, etc. et ce, à l'aide de tables de corrélation (Williams et Fleming, 1989) (Figure 53).

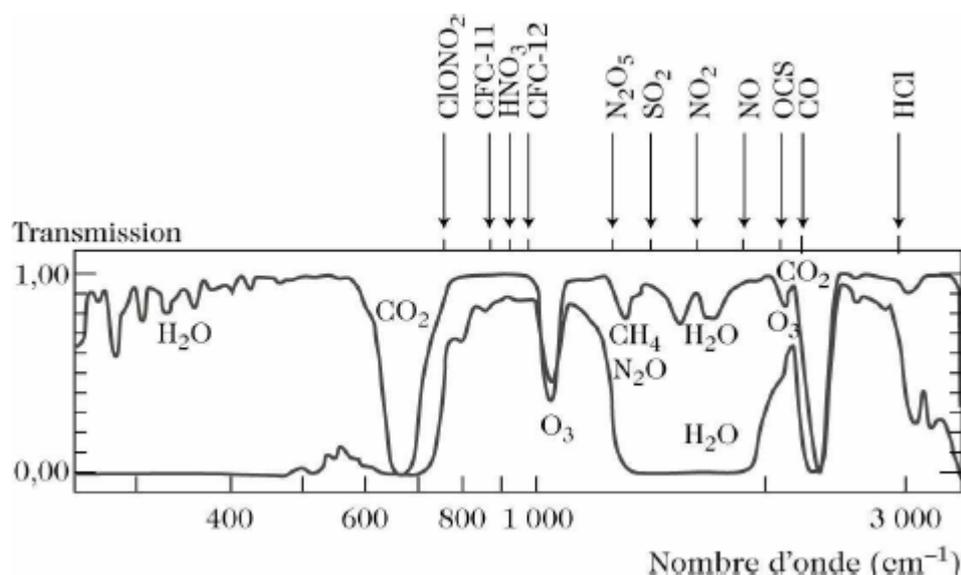


Figure 53 : Spectre d'infrarouge (IR) (Brasseur *et al.*, 1999)

4.3. Spectroscopie de masse :

4.3.1. Principe :

Comme son nom l'indique, la spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Le principe de cette mesure repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions. Ce principe impose aux molécules et atomes d'un échantillon d'être préalablement transformés en ions en phase gazeuse, avant d'être analysés par un spectromètre de masse. Un spectromètre de masse comporte toujours (Figure 54):

- une source d'ionisation : passage de l'échantillon en phase gazeuse et ionisation des molécules

- un analyseur : séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z)
- un détecteur : il permet une détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés.
- un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres (Suarez, 2013).

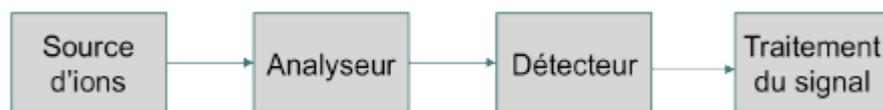


Figure 54 : Etapes de la spectrométrie de masse (Suarez, 2013).

En général, la spectrométrie de masse en tandem (en anglais, mass spectrometry/mass spectrometry ou MS/MS) combine deux analyseurs, de manière à obtenir une bonne résolution de masse ainsi que des informations structurales sur les échantillons. Elle peut être réalisée à l'aide de nombreux appareils (trappe ionique, analyseurs magnétiques, analyseurs de temps de vol...). (Suarez, 2013).

Le principe reste identique à la spectrométrie de masse « simple » (Figure 55).

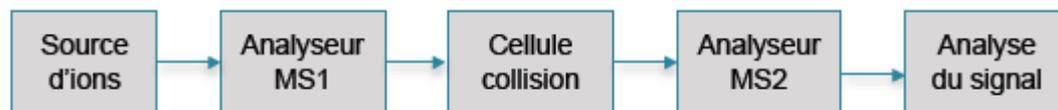


Figure 54: Etapes de la spectrométrie de masse en tandem (Suarez, 2013).

➤ Ionisation douce :

Il y a une trentaine d'années, la capacité d'analyser des macromolécules par des techniques de « soft ionization » a été décrite. L'ionisation douce de protéines est l'étape clef de l'identification bactérienne puisqu'elle permet l'analyse de macromolécules telles que les protéines, dont les tailles peuvent aller jusqu'à 100 kiloDalton (kDa) (Albrethsen, 2007). Les principales techniques d'ionisation douce utilisées dans l'identification des micro-organismes sont l'électrospray ionization (ESI) et le MALDI, basées soit sur l'analyse des spectres protéiques, soit sur l'amplification de matériel génétique (Kaleta *et al.*, 2011). Nous n'aborderons ici que l'analyse des spectres protéiques. L'ESI et le MALDI sont tous deux intéressants à utiliser pour l'analyse des macromolécules biologiques (Figure 56).

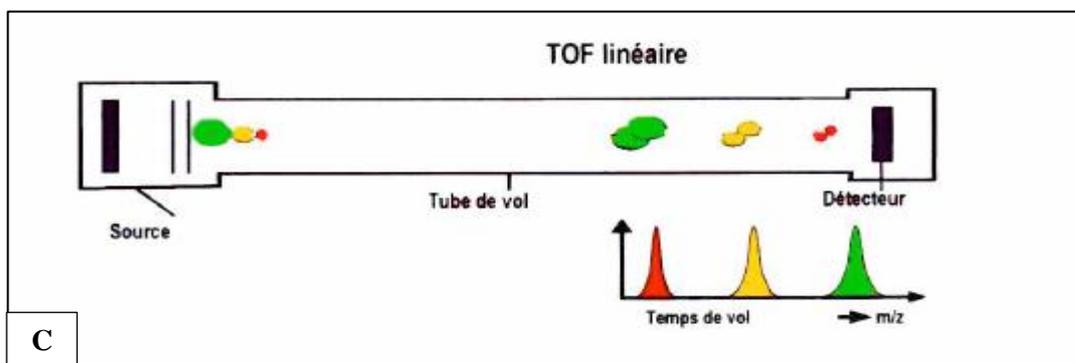
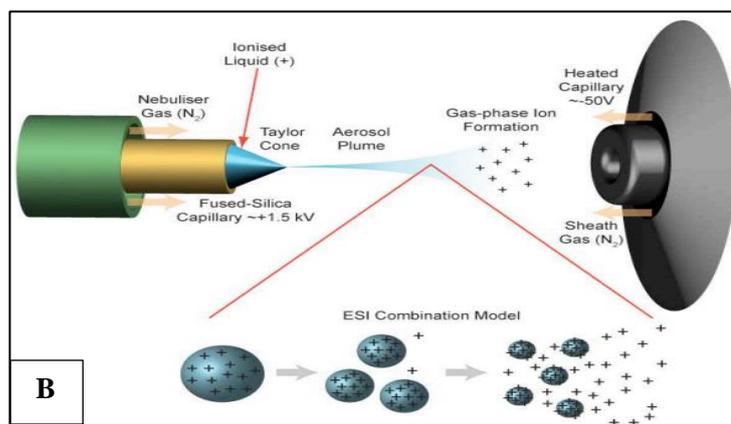
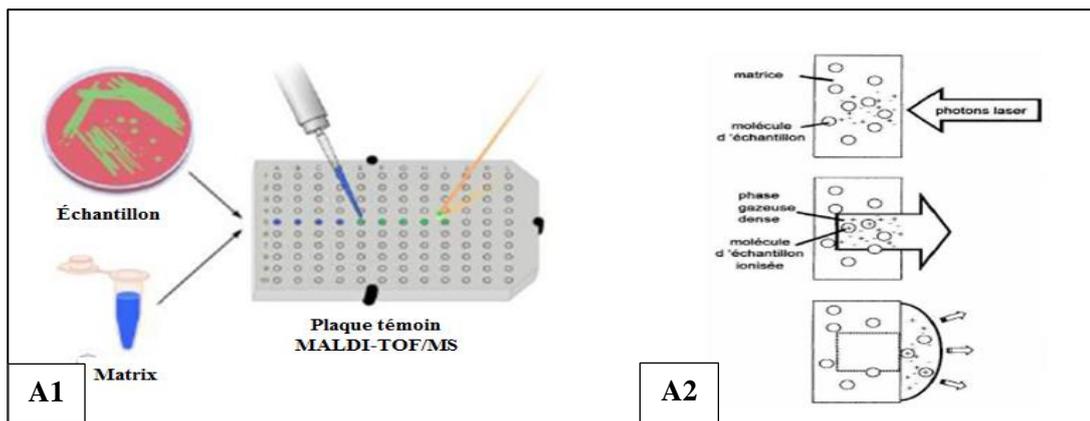


Figure 56 : Principe des techniques utilisées (Suarez, 2013).

A1/A2 : Étapes préalables à l'identification par MALDI-TOF MS et ionisation par MALDI.

B : Ionisation par électro-nébulisation

C : Schéma d'un tube de vol linéaire

4.3.2. Application :

La technique utilisée est qui permet de déterminer le poids moléculaire (PM) des antibiotiques ainsi que ceux des fragments qui en résultent après ionisation des ions parents. Cette étude est réalisée sur un spectrophotomètre LCQ ion-trap (Finnigan MAT, San José, CA). La technique employée

permet d'analyser de très faibles quantités de produit. L'analyse est réalisée en mode positif et en mode négatif. La fragmentation progressive des ions parents est suivie jusqu'à épuisement du produit. Le programme d'analyse utilisé est Xcalibur 1.2 de ThermoDuest (Figure 57) (Aouiche, 2013).

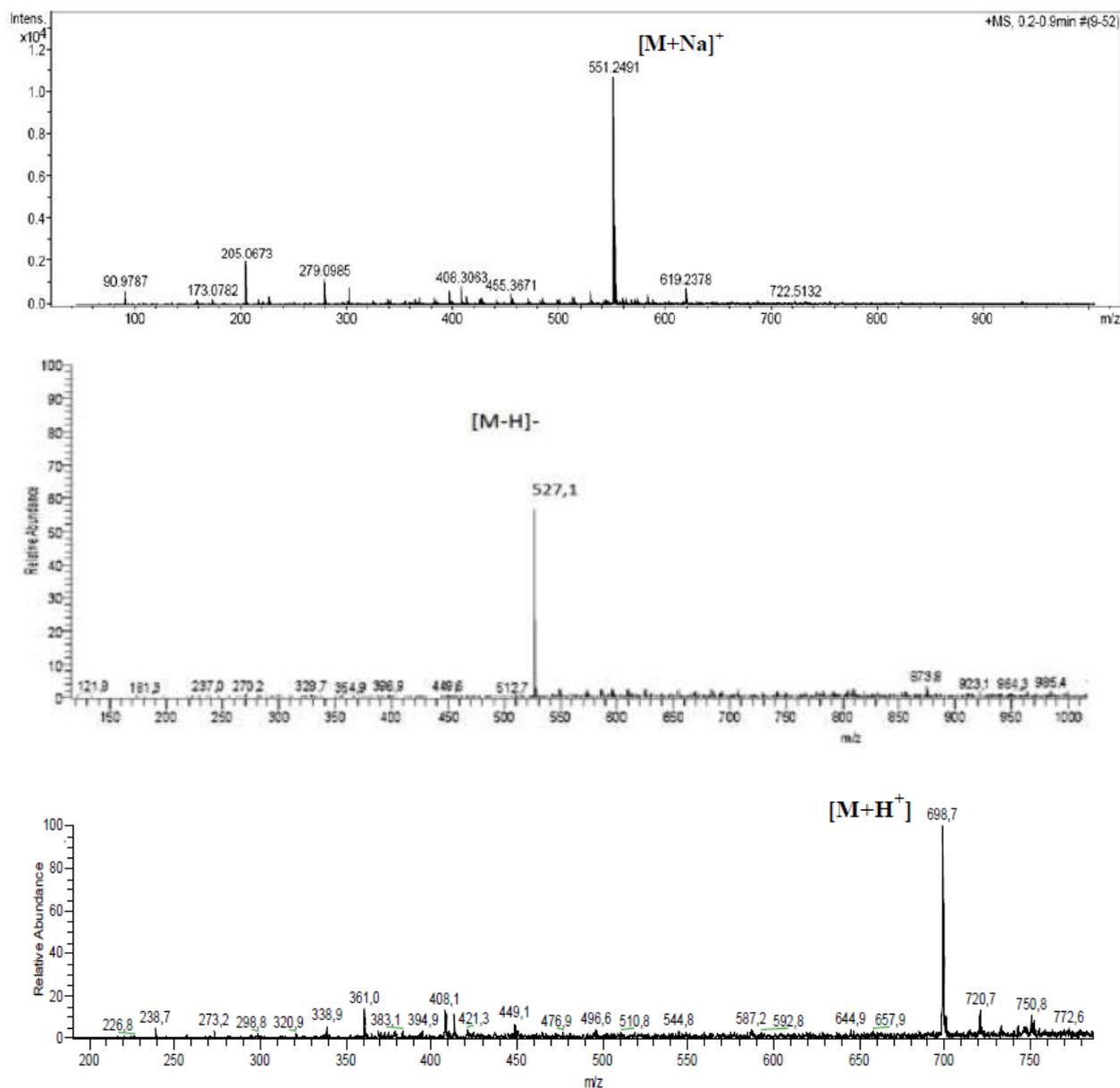


Figure 57 : Résultats des spectres d'antibiotique par technique de spectrométries de mass (Aouiche, 2013)

4.4. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) :

La RMN est une technique spectroscopique initialement développée par Felix Bloch et Edward M. Purcell qui repose sur les propriétés magnétiques du noyau atomique. Depuis 1946, il est devenu un outil puissant et extrêmement précieux pour les chimistes, les physiciens, les biochimistes et plus

récemment pour les médecins (Friebolin, 2005). La technique offre l'avantage de l'analyse directe du mélange, et par conséquent, la RMN a démontré un potentiel unique à utiliser pour l'analyse du mélange métabolique, y compris les bactéries fastidieuses. La RMN peut être utilisée pour étudier directement des échantillons biologiques et des cultures cellulaires sans nécessiter de préparation importante d'échantillon. De plus, la technique permet de déterminer des rapports composés de manière hautement reproductible. Pour ces raisons, la métabolomique et la métabonomie sont à l'origine de nouvelles avancées technologiques dans le domaine de la RMN (García-Álvarez *et al.*, 2013).

4.4.1. Principe :

La base de la technique consiste à utiliser les propriétés magnétiques des noyaux atomiques qui sont définies par leur moment cinétique et leur moment magnétique associé. Les deux moments sont des grandeurs vectorielles, et ils sont reliés par une constante appelée constante gyromagnétique (γ), qui est spécifique à chaque type de noyau atomique. Selon la mécanique quantique, les deux moments sont quantifiés et leur valeur dépend d'un nombre quantique appelé spin (I). Tous les noyaux ne sont pas valides pour obtenir des signaux RMN (Figure 58), seuls ceux dont les spins sont supérieurs à zéro sont valides, mais ^1H ou proton est le noyau le plus utilisé dans les études de RMN. De plus, plus la valeur de la constante γ est élevée, plus le noyau actif sera sensible en RMN (García-Álvarez *et al.*, 2016).

Ainsi, ^1H est le noyau utilisé dans les études de RMN en raison de sa grande abondance (100%) et de sa valeur élevée de γ . Cependant, d'autres noyaux magnétiquement actifs avec une sensibilité plus faible peuvent être utilisés, tels que ^2H (ou D), ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P et ^{23}Na . En se concentrant sur le proton, en présence d'un champ magnétique externe (B_0), deux niveaux d'énergie différents apparaissent. Les moments magnétiques de ces noyaux essaient de s'aligner sur B_0 , ce qui donne deux orientations possibles à ce moment-là. Chacune de ces orientations correspond à un niveau d'énergie différent. C'est-à-dire qu'en présence de B_0 , les noyaux peuvent être disposés dans deux nouveaux états avec des énergies différentes. Ce phénomène, d'un point de vue vectoriel, est connu sous le nom d'aimantation (García-Álvarez *et al.*, 2016).

Pour obtenir un signal RMN, l'échantillon est irradié par une onde radiofréquence, perpendiculaire à B_0 , qui l'oblige à atteindre l'état de résonance, où les noyaux tournent avec une fréquence de résonance (f_0), spécifique à chaque noyau atomique et appelée fréquence de Larmor. Pour cette raison, les spectromètres RMN sont désignés par la fréquence de résonance ^1H au lieu du champ magnétique (par exemple, sur un champ de 14,1 T, ^1H résonne à 600 MHz). Après l'impulsion, les noyaux excités reviennent à l'état d'équilibre initial en émettant un signal radiofréquence, qui se désintègre avec le temps, phénomène connu sous le nom de relaxation (García-Álvarez *et al.*, 2016).

La résonance des aimants nucléaires excités est détectée sous la forme d'un courant oscillant dans une bobine placée autour de l'échantillon. Une raie dans le spectre RMN obtenue à une certaine fréquence (ou déplacement chimique) correspond à un noyau atomique avec un environnement chimique donné, ce qui permet des informations structurales sur la molécule à laquelle il appartient (García-Álvarez *et al.*, 2016).

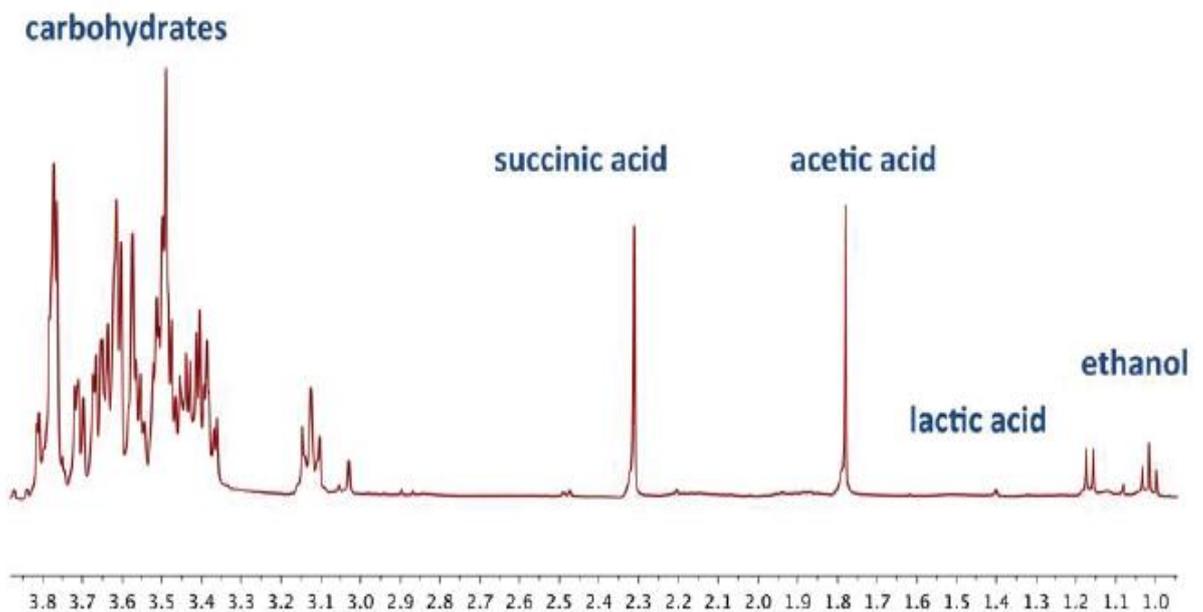


Figure 58: Spectre RMN 1H montrant les principaux métabolites (García-Álvarez *et al.*, 2016).

Ensuite, un échantillon biologique est ajouté à un tube RMN de 5 mm avec du D₂O avec l'ajout du sel de sodium (triméthyl) propanoïque- acide 2,2,3,3-d₄ (TSP) pour l'étalonnage par déplacement chimique. La figure 59 présente un aperçu des composants de l'équipement de RMN (García-Álvarez *et al.*, 2016).

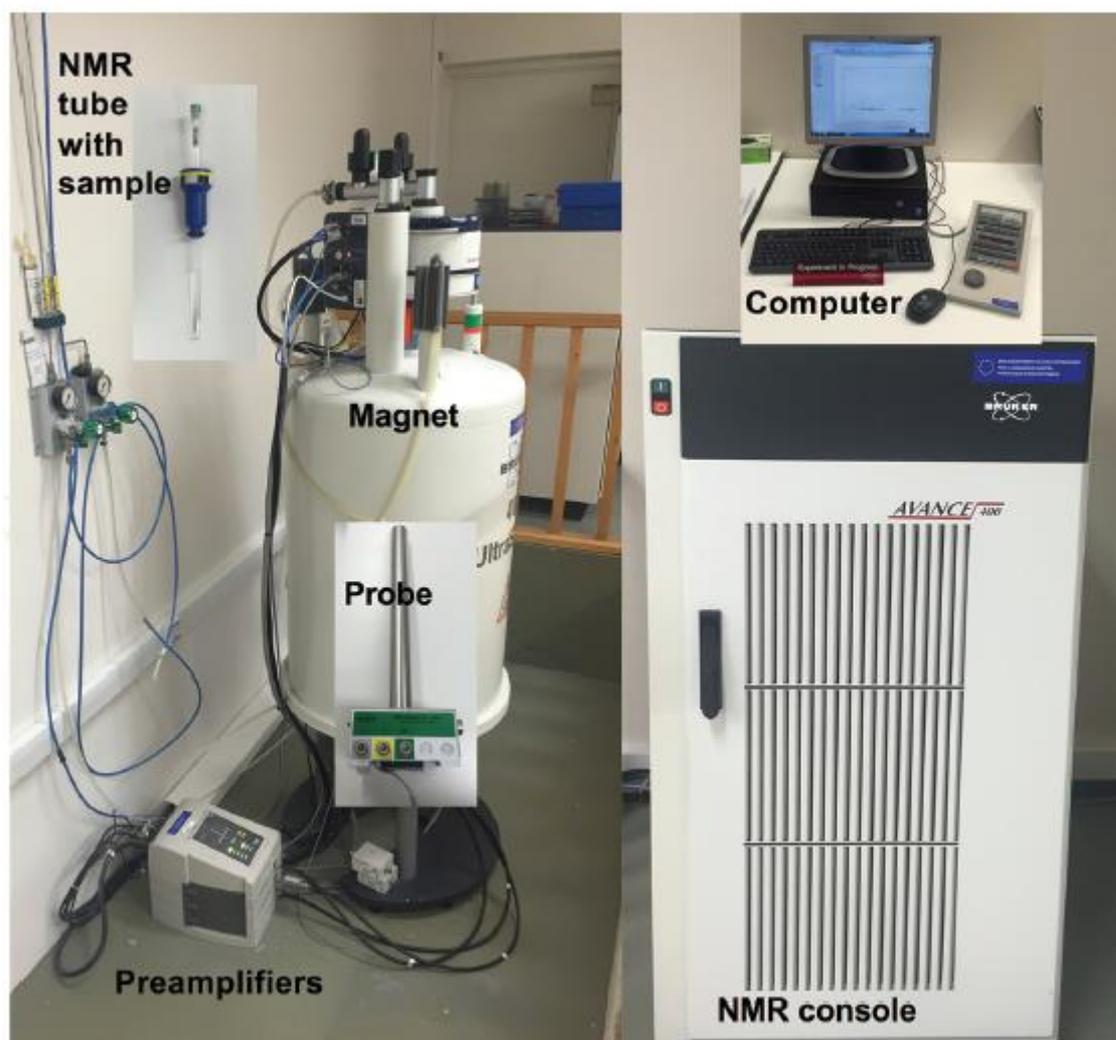


Figure 59: Composants d'un équipement de RMN (García-Álvarez *et al.*, 2016).

4.4.2. Application :

L'application de la RMN du ^1H aux cellules vivantes est utilisée pour déterminer les métabolites dans des mélanges complexes et a été largement utilisée pour l'identification et la quantification des espèces bactériennes (Plummer, 2007). Cette technique a également été appliquée pour des études de sensibilité aux médicaments antimicrobiens sur différentes espèces de levures, et au cours des dernières années, elle a également été développée pour des études bactériennes. De plus, d'autres déterminations directement dans les fluides corporels sont apparues pour aider au diagnostic de différentes maladies et affections (García-Álvarez *et al.*, 2016).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) protonique et du carbone ^{13}C et des corrélations ^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C (COSY, HSQC et HMBC). Les échantillons ont été solubilisés dans du chloroforme deutéré (CDCl_3) ou du méthanol deutéré (CD_3OD). Les déplacements chimiques sont

exprimés en ppm en utilisant comme référence le signal du CHCl_3 en RMN ^1H ($\delta = 7.26$ ppm) et celui du CDCl_3 en RMN ^{13}C ($\delta = 77.16$ ppm) (figure 60) (Souagui, 2015).

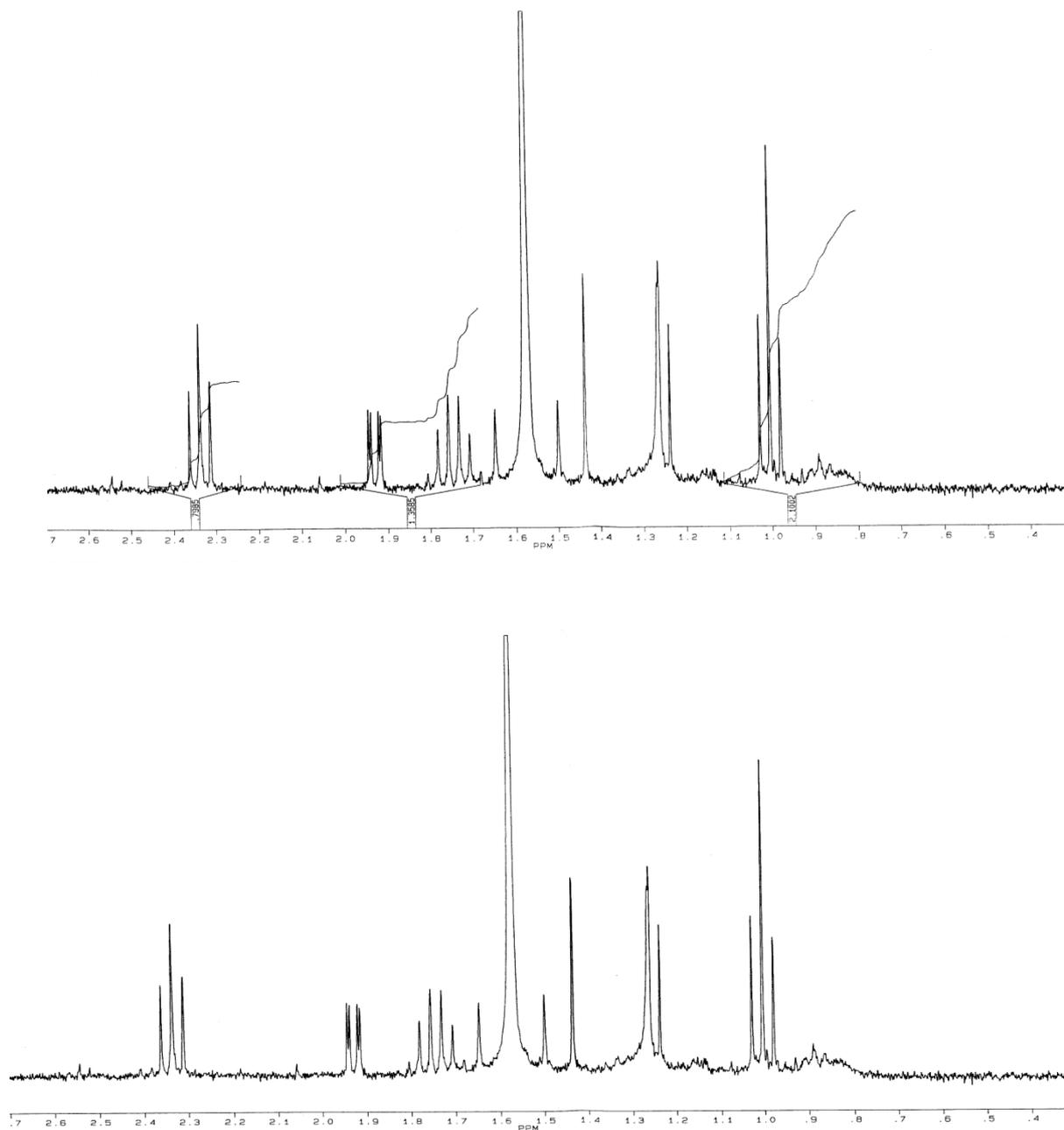
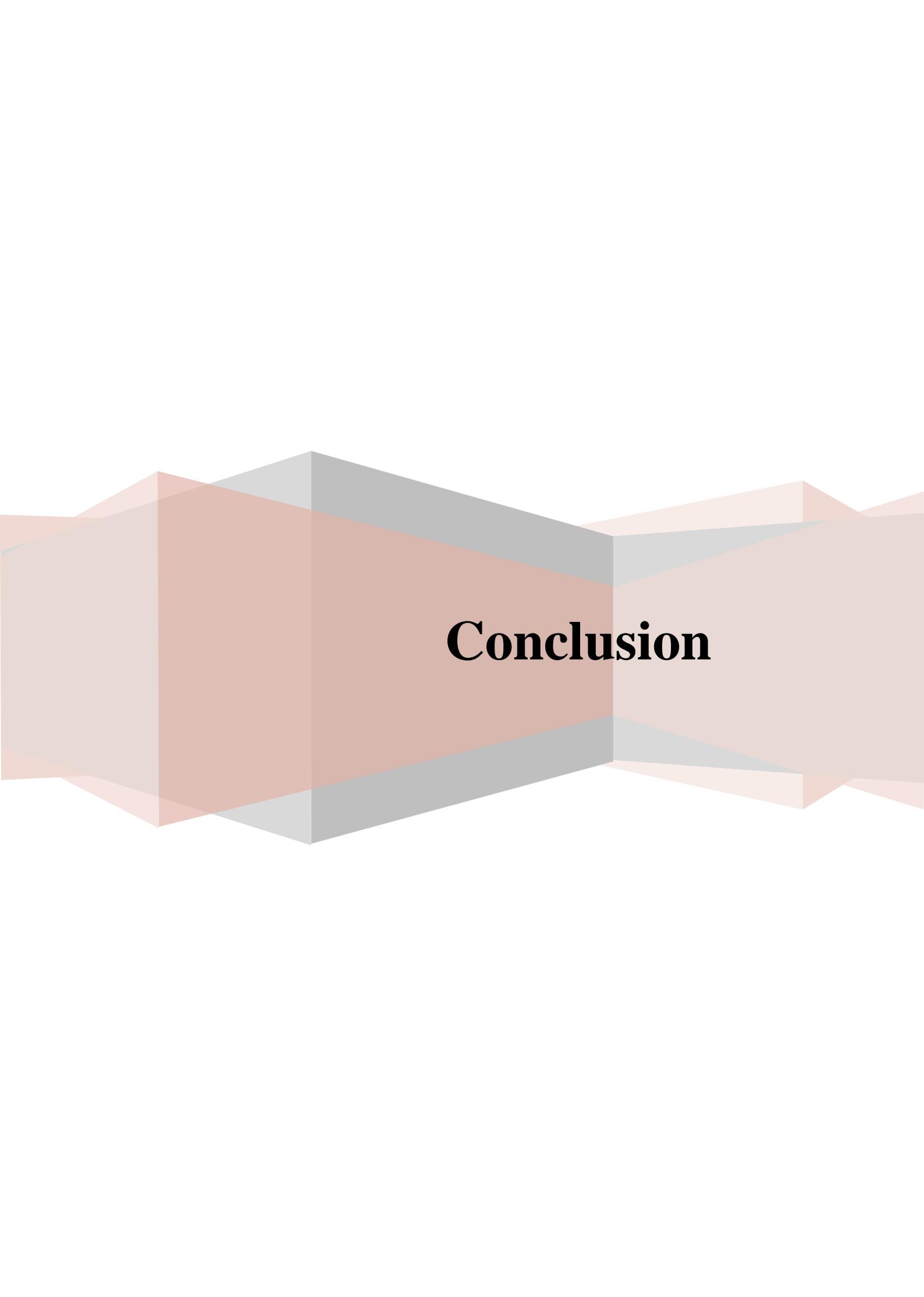


Figure 60 : Résultats des spectres d'antibiotique par technique de spectrométries de mass par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Lamari, 2006).



Conclusion

La résistance microbienne aux molécules bioactives constitue un problème important lorsqu'elle concerne des micro-organismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un micro-organisme à résister aux agents antimicrobiens pour lequel il est normalement sensible ; la propagation de ces bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure. Face à une demande croissante pour des alternatives comme des nouveaux antibiotiques, les efforts de la recherche se sont orientés vers les nouvelles molécules ayant un plus grand d'action sur différents types d'agents pathogènes (**Harir, 2018**).

L'une des stratégies suivies dans la recherche de nouvelles molécules antibiotiques consiste à isoler des actinobactéries à partir d'écosystèmes peu ou pas explorés. Ainsi, les nouvelles souches d'actinobactéries pouvant être sources de nouvelles molécules antibiotiques (**Souagui, 2015**). Les actinobactéries sont encore une source prolifique de produits naturels avec des caractéristiques chimiques inspirantes, comme en témoigne les nouveaux agents antimicrobiens découverts au cours des 10 dernières années. Etant donné que la majorité des produits secondaires ne sont pas encore cultivables en laboratoire, le potentiel de découverte de nouveaux métabolites d'actinobactéries est prometteur et loin d'être épuisé (**Genilloud, 2018**).

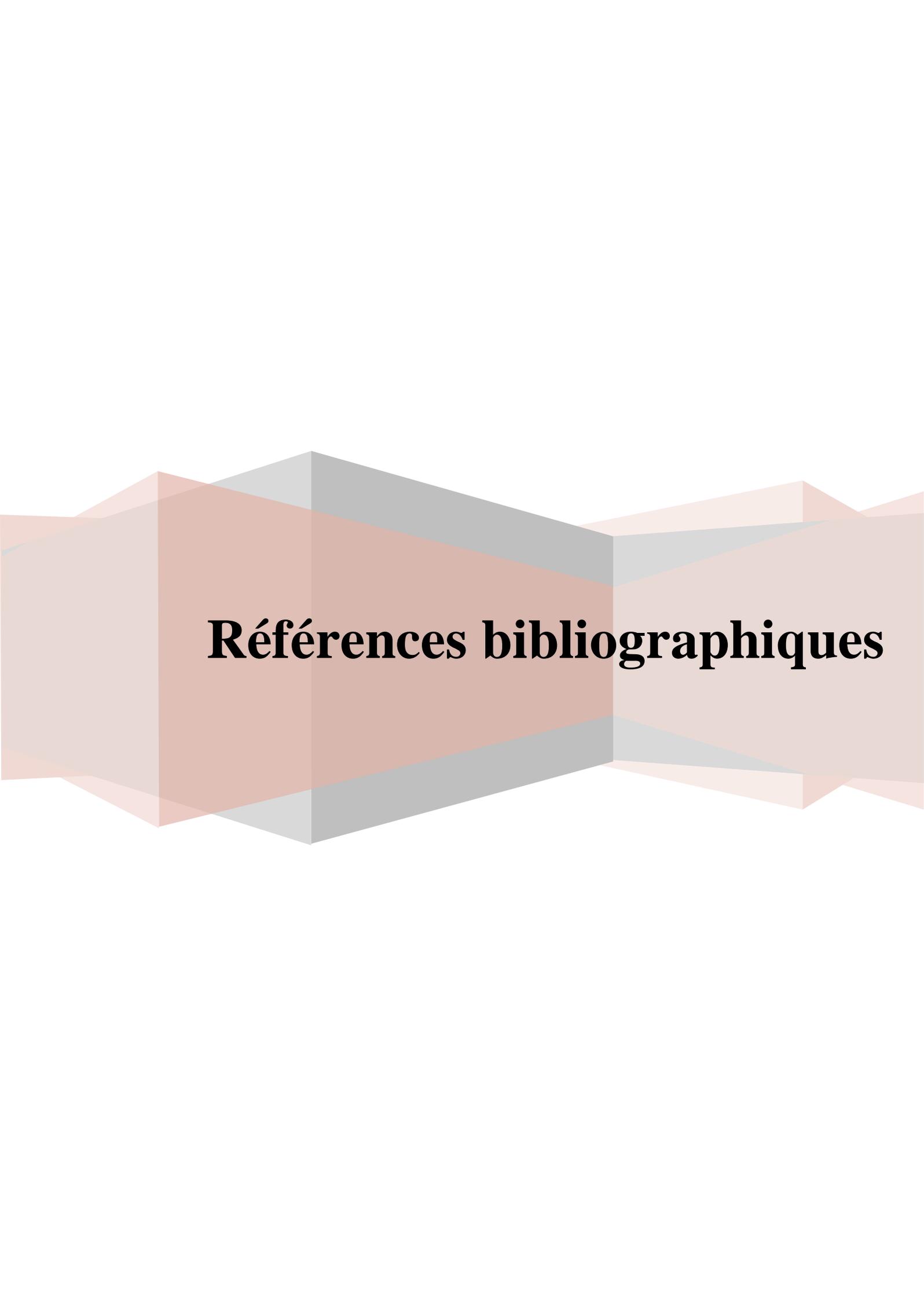
L'objectif mondial de l'étude des actinobactéries est de trouver de nouveaux genres producteurs de métabolites secondaires et présentent un intérêt pharmacologique et commercial élevé (**Dharumadurai, 2016**).

Les communautés d'actinobactéries se sont avérées produire une grande diversité de nouveaux composés de différentes classes de produits naturels, tels que Antimicrobiennes. Les technologies ouvrent de nouvelles voies pour étudier les rôles potentiels des actinobactéries et les effets des composés antimicrobiens sur les micro-organismes résistants (Genilloud, 2018).

Bibliographique sur les études qui ont été faites sur les actinobactéries nous guiderons vers :

- ❖ La réalisation d'un isolement et une sélection des membres les plus prometteurs de ces communautés microbiennes et leur criblage pour la production de nouveaux composés bioactifs ;
- ❖ L'utilisation des différents milieux de cultures en fonction des conditions physico-chimiques de l'échantillon et du genre souhaité à isoler et connaître les différents prétraitements chimiques et physiques appliqués pour améliorer l'isolement ;

- ❖ Connaître les techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne est assurée par l'application des approches de criblage où une multitude de techniques décrites dans la littérature ont été rapporté dans ce travail ;
- ❖ La maîtrise des techniques utilisées pour réaliser une fermentation liquide ou solide et l'extraction des biomolécules se fait selon des protocoles bien précis et optimisés, d'une part pour préserver la qualité et la pureté des molécules, et d'autre part, pour garantir une bonne production ;
- ❖ Une Purification et analyse de composés extraits d'actinobactéries par des techniques de spectroscopie bien précises.



Références bibliographiques

- **Adinarayana K., Ellaiah P., Srinivasulu B., Bhavani Devi R. and Adinarayana G. (2003)** Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. *Process Biochem.* **38**: 1565-1572.
- **Al_husnan, L. A., et Alkahtani, M. D. F. (2016).** Molecular Identification of *Streptomyces* producing antibiotics and their antimicrobial activities. *Annals of Agricultural Sciences*, *61(2)*, 251–255.
- **Albrethsen, J. (2007).** Reproducibility in Protein Profiling by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, *53(5)*, 852–858.
- **Amin DH, Abolmaaty A, Tolba S, Abdallah NA, Wellington EM (2017).** Phylogenic characteristics of a unique antagonistic *Micromonospora* sp. Rc5 to *S. aureus* isolated from Sinai Desert of Egypt. *Curr Res Microbiol Biotechnol* *5(6)*:1295–1306.
- **Andes D., Proctor R., Bush R K., & Pasic T R. (2000).** Report of Successful Prolonged Antifungal Therapy for Refractory Allergic *Fungal Sinusitis*. *Clinical Infectious Diseases*, *31(1)*, 202 -204.
- **Anne J, Fèvre M, Sanglier JJ (1989)** Améliorations génétiques des souches. *In: Larpent JP, Sanglier JJ (Eds) Biotechnologies des antibiotiques*, Masson, Paris, 473 p.
- **Aouiche A., (2013).** Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigènes pour l’homme. Thèse de doctorat, ENS Kouba. Algérie.
- **Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP (2005).** Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indian J Med Res* *121*:164–170.
- **Badji B (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d’actinomycètes d’origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou. 226 p.
- **Balagurunathan R., Radhakrishnan M., Shanmugasundaram T., Gopikrishnan V and Jerrine J (2020).** Protocols in actinobacterial research. *Springer Protocols Handbooks New York , U.S.A .*
- **Balkis, M. M., Leidich, S. D., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002).** Mechanisms of Fungal Resistance. *Drugs*, *62(7)*, 1025–1040.
- **Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K., (2016).** Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity : à review. *Journal of pharmaceutical analysis.* 6.71-79.
- **Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P et al (2016).** Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* *80(1)*:1–43.

- **Becker B, Lechevalier MP, Gordon RE, Lechevalier HA (1964).** Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol* 12:421–423
- **Becking J. H. (1974).** Family III. *Frankiaceae*. In: *Bergey Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Eds. Buchanan R. E. and Gibbons N. E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701-706.
- **Belghiti M.L., Chahlaoui A., Bengoumi D et El Moustaine R.(2013).** Etude de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux souterraines de la nappe plio-quaternaire dans la région de Meknès (MAROC). *Larhyss Journal*. 14(1112-3680). 21-36
- **Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., et al. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* ,417(6885), 141–147.
- **Berdy J, Aaszalos A, Mc Nitt KL., (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds. Microbial metabolites. Vol XIII. Parts 1, 2, 3. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012).** Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). vol 5: The Actinobacteria. 2^{ème} édition, Springer, New York. 1750 p.
- **Bhathena ZP, Vora C, Kadam K (2002).** Rapid bioremediation of phenolic effluent through use of actinomycal consortium. *Pollution Research* 21(3):265–275.
- **Binson G., (2017).** Validation d'une méthode de dosage de préparations buvables pédiatriques à l'aide de la spectrométrie UV/Raman directe. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, université de Poitiers. France.
- **Boerlin P., White D.G., (2006).** Antimicrobial resistance and its epidemiology. In : Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. (Eds), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Fourth Edition. Blackwell publishing : Ames, 27-43.
- **Borderie F., (2014).** Utilisation du rayonnement UV-C comme méthode alternative aux produits chimiques dans la lutte et le contrôle de la prolifération des micro-organismes sur les matériaux du patrimoine. Thèse de Doctorat, Université de FRANCHE-COMTÉ.
- **Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F, Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013).** *Saccharothrix saharensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:3744–3749.
- **Boudoudou H., Hassikou R ., Amina Ouazzanittouhami A ., Badoc A ., Douira A. (2009).** Paramètres physicochimiques et flore fongique des sols de rizières marocaines. *Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux* 148(1-4).17-44

- **Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2008).** Precursor directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry.*, 43:1244–1252.
- **Brasseur G. P., Orlando, J. J. and Tyndall, G. S. (1999).** *Atmospheric chemistry and global change.* Oxford University Press, Cambridge.
- **Bredholdt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjærvik, E., Terekhova, L. P., & Zotchev, S. B. (2007).** Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the *Trondheim fjord, Norway*: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*, 9(11), 2756–2764.
- **Breton A, Theilleux J, Sanglier JJ, Vobi G (1989).** Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. *In: Larpent JP, Sanglier JJ (Eds). Biotechnologie des antibiotiques.* Masson, Paris. pp. 33–70.
- **Bu'Lock J.D., (1975).** Secondary metabolite in fungi and its relationship to growth and development. *In: The Filamentous Fungi.* (Smith, J.E. and Berry, R.D. Eds). Wiley and Soc. Lnc. Vol 1 : 35-38.
- **Busti E, Monciardini P, Cavaletti L, Bamonte R, Lazzarini A, Sosio M et al (2006).** Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiol* 152(3):675–683.
- **Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017).** Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, 133, 86–96. doi:10.1016/j.bcp.2016.11.019.
- **Cao YR, Jiang Y, Wang Q, Zhao LX, Jin RX and Jiang CL., (2010).** Diversity and some bioactivities of cultured actinomycetes in four areas in Sichuan and Yunnan. *Acta Microbiol Sinica.* 50(8):995–1000.
- **Castelli, M. V., Butassi, E., Monteiro, M. C., Svetaz, L. A., Vicente, F., & Zacchino, S. A. (2014).** *Novel antifungal agents: a patent review (2011 – present).* *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(3), 323–338.
- **Chandwad S, et Sudhakar G., (2019).** Isolation of Actinomycètes from soil sample usihg different pretreatment methods and its comparative study. Department of Microbiology, Research Center, PVP College , Patoda, Pin 414204, Beed, Maharashtra, India.
- **Collins MD., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin DE. (1977).** Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol.*, 100:221–230.
- **Concepción R, Boronat A (2013).** Isoprenoid biosynthesis in prokaryotic organisms manuel. *In: Bach TJ, Rohmer M (Eds). Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: New concepts and experimental approaches.* Springer Verlag, New York Inc. pp: 1–16.
- **Corke, C. T., & Chase, F. E. (1956).** The selective enumeration of actinomycetes in the presence of large numbers of fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 2(1), 12-16.

- **Coskun, O. (2016).** Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*. 3(2):156–60.
- **Dancer S.J.(2004).**How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(10), 611-619.
- **Danilenko V.N., Mironov V.A., Elizarov S.M. (2005).** Calcium as a Regulator of Intracellular Processes in Actinomycetes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(4), 319–329.
- **Das M, Dasgupta D., (1998).** Pseudo-affinity column chromatography based rapid purification procedure for T7 RNA polymerase. *Prep Biochem Biotechnol*;28:339–48.
- **Dastager S. G., Li W. J., Agasar D., Sulochana M.B., Tang S. K., Tian X. P. and Zhi X.Y. (2007)** *Streptomyces gulbargensis* sp. nov., isolated from soil in Karnataka, India. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91:99–104.
- **Davies J. and Mazel D. (1997).** Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofutur*. 170: 14-17.
- **Demain A.L., Dykhuizen L. (2006).** Ecology and industrial microbiology. Editorial Overview. *Current Opinion in Microbiology*, 9,237-239.
- **Dharumadurai D, (2016).** *Actinobacteria*. Basic and biotechnological applications. *Intech open. Croatia* .398 p.
- **Djaballah C. (2010).** Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkhah d'Ain Mlila. These de Magister, Université Constantine 1.
- **Doull J I., Vining L E. (1990).** Nutritional control of actinotoxin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol 32 : 449-454.
- **Driche E (2010).** Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS Kouba, Alger.
- **El-Tarabily K. A. and Sivasithamparan K. (2006).** Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Bioch.*, 34: 1-16.
- **Euzéby J. P. (2002).** Les taxons bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 2001. *Revue Méd. Vét.*, 153: 5-14.
- **Fleming A., (1945).** Penicillin. Nobel lecture, December 11, 1945. [pdf en ligne] Adresse URL : <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/>. html consulté le 29/09/2021.
- **Ganesan, P., Reegan, A. D., David, R. H. A., Gandhi, M. R., Paulraj, M. G., Al-Dhabi, N. A., & Ignacimuthu, S. (2017).** Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. *Alexandria Journal of Medicine*, 53(2), 101–110.

- **Gao B et Gupta R S., (2012).** *Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 66–112.
- **Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004).** Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg (Eds).vol 4, p 401.
- **Genilloud O., (2018).** Mining actinomycetes for novel antibiotics in the omics era : are we ready to exploit this new paradigm ? *Journal antibiotics*. Vol. 7 (4):85. 13p.
- **Gesheva V, Ivanova V, Gesheva R (2005).** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol Res* 160:243–248.
- **Gibbs, W. J., Drew, R. H., & Perfect, J. R. (2005).** *Liposomal amphotericin B: clinical experience and perspectives. Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 3(2), 167-181.
- **Girard H., Rougieux R. (1967).** Technique de microbiologie agricole. Ed. Dunod, Paris,France, 216 p.
- **Goodfellow M. (2012).** Phylum XXVI.Actinobacteria phyl.nov. In: Goodfellow *et al.*. (Editors). Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The *Actinobacteria*, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. Pp. 1–28.
- **Goodfellow M. and Williams S. T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37: 189-216.
- **Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Suzuki K., Ludwig W., Withman W.B. (2012).** Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The *Actinobacteria* (2èmeEds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London.p. 2083.
- **Goodfellow M., Stalon L.J., Simpson K.E., and Minnikin D.E. (1990).** Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *Journal of General Microbiology*, 136(1), 19 -36.
- **Gottlieb D. (1973).** General Consideration and implication of the Actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F. A. Sk.
- **Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JR., (1996).** Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol*;268:142–52.
- **Gray, T R G. et Williams, S T (1971).** Methods for study-ing the ecology of soil micro-organisms. 1971 pp.116 pp.
- **Guardabassi L, Courvalin P., (2006).** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In : Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press : Washington, 1-18.

- **Gunasalus I.C. (1986).** The *Bacteria*. A Treatise on structure and function. *Edition Academic Press Inc, London*. 632 p.
- **Gupta, A. K., & Versteeg, S. G. (2016).** *Tavaborole – a treatment for onychomycosis of the toenails*. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(9), 1145–1152.
- **Gupte M., Kulkarni P., Ganguli B.N. (2002).** Antifungal antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (1), 46–57.
- **Harir, M., (2018).** Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactériés isolées des sols arides et semi arides d'Algérie. Thèse de Doctorat, Université d'Oran 1, Ahmed Ben Bella - Algérie, 174p.
- **Hassan A.A., El-Barawy A.M., El Mokhtar., M.N. (2011).** Evaluation of biological compound of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. *Journal of American science*, 7(4),752-760.
- **Hayakawa H (2008).** Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica* 22:12–19.
- **Hébert S et Légaré S. (2000).** Suivi de la qualité des rivières et petits cours d'eau. Ministère de l'Environnement gouvernement du Québec.
- **Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E (1997).** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* 63(8):3233–3241.
- **Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994).** In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- **Holzappel W, Brost I, Faerber P, Geisen R, Bresch H, Jany KD, Mengu M, Jakobsen M, et al. (2002).** Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone. *PCT Int Appl* 19:140–150.
- **Hulin A., Deguillaume A.M., Bretagne S. and Bézie Y. (2005).** Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives. *Journal de Pharmacie Clinique*, 24, 125-138.
- **Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG, Fenical W (2005).** Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *A Van Leeuw* ; 87(1):43-48.
- **Jiang C et Xu L., (1993).** Actinomycete diversity in unusual habitats. *Actinomycetes.*; 4(2): 47-57.
- **Jiang Y., Li Q., Chen X and Jiang C. (2016).** Isolation and cultivation methods of Actinobacteria. In Dharumadurai D and Yi J. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* (39-57). *IntechOpen*.
- **Kaleta, E.J., Clark, A.E., Johnson, D.R., Gamage, D.C., Wysocki, V.H., Cherkaoui, A., Schrenzel, J., Wolk, D.M (2011).** Use of PCR coupled with electrospray ionization mass

spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. *Journal of clinical microbiology*. 49, 345-353.

- **Kämpfer P. (2010).** *Actinobacteria*. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology Part 19, 1819–1838.
- **Kapoor G, Saigal S, and Elongavan A., (2017).** Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2017 Jul-Sep; 33(3): 300–305.
- **Keirsse J., (2003).** Spectroscopie infrarouge déportée : mise au point d'un biocapteur pour l'imagerie métabolique et la sécurité microbiologique. Thèse de Doctorat d'Etat, université de Rennes 1, France.
- **Kerstin HE., (2006).** Molecular Phylogenetic Analyses and Real Life Data. Universität zu Köln, Botanisches Institut, Lehrstuhl I, Gyrhofstr. 15, 50931 Köln.
- **Khalil D., (2016).** Résistance aux antibiotiques chez *Mycoplasma bovis* : mécanismes moléculaires et évolution en France. *Microbiologie et Parasitologie*. Université de Lyon, France. 131p.
- **Kim S.B., Lee J. Y. and Hwang B. K. (1998).** Diversity of actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and sea-mud soils of Korea. *J. Microbiol.*, **36**: 86-92.
- **Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., Goodfellow M. (2004).** Taxonomic Study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil land description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (1), 211-214.
- **Kitouni, M., (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Th doctorat : Microbiologie : Université Mentouri- Constantine.
- **Knight V., Sanglier J.J., DiTullio D., Braccili S., Bonner P., Waters J., Hughes D and Zhang L. (2003).** Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied microbiology and biotechnology* 62(5-6).446–458. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1381-9>
- **Kumar R.R and Jadeja V.J. (2016).** Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5(5). 606-618.
- **Labeda D. P., (1990).** Isolation of Actinomycetes for biotechnological applications. In *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature* (Labeda, D. P., ed.), New York: McGraw Hill Publishing Company. pp. 1–19.
- **Labeda D.P., and Lechevalier M.P. (1989).** Amendment of the genus *Saccharothrix* Labeda *et al.* 1984 and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *saccharothrixmutabilis* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39 (4), 420–423.

- **Labeda DP., Testa RT., Lechevalier MP., Lechevalier HA. (1984).** *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiopsis*. *Int J Syst Bacteriol.*,34:426–431.
- **Lamari L (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 186 p.
- **Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.-C., Bouizegarène, P., & Bogard, M. (2008).** Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, 23(5), 260–279. doi:10.1016/j.
- **Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris, 481 p.
- **Lechevalier H.A., and Lechevalier M.P. (1981).** Introduction to the order Actinomycetales. In: The procaryotes, Eds : Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Springer-Verlag. Berlin, 2, 1915-1922.
- **Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. (1970).** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: The *Actinomycetales*. Prauser H. (Eds). G. Fisher Verlag, Jena, p. 393–405.
- **Lechevalier M.P. (1972).** Description of a new species, *Oerskovia xanthineolytica* and emendation of *Oerskovia* Prauser *et al. International Journal of Systematic Bacteriology*, 2, 260–264.
- **Lechevalier M.P., De Bievre C., Lechevalier H.A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical systematics and ecology.*, 5, 249-260.
- **Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J.M., Aintpierre-Bonaccio D., Rifai S., Fassouane A. and Boiron P. (2003).** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 669–674.
- **Leroux P. (1987).** La résistance des champignons aux fongicides. *Phytoma*, 2 (385), 6-14.
- **Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016a).** Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. doi:10.5772/61462
- **Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016b).** Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. doi:10.5772/61461.
- **Lilley G., Clark A.E and Lawrence G.C, (1981).** Control of the production of cephamycin C and thienamycin by *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* Vol 31 : 127- 134.
- **Logan N. A. (1994).** Bacterial Systematics. *Edition Blackwell Scientifique Publications. London.* 272 p.

- **Manpreet S, Sawraj S, Sachin D, Pankaj S and Banerjee U C., (2005).** Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 1(2) 2005, pp. 1-9.
- **Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H. R., Schwämmle, V., & Jensen, O. N. (2010).** Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(7), 1423-1436.
- **Marston A., (2011).** Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry, *J. Chromatogr. A* 1218:2676–2683.
- **Martínez-Medina G., Prado L.A., Ruiz H., Ilyina A., Martínez-Hernández J., Rodríguez-Jasso R., Hoyos-Concha J.L., Aguilar-González C. (2019).** Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. *In* Kuddus M (Ed.). *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. (221-246). Elsevier
- **Mayers D L, Sobel J D, Ouellette M, Kaye K S, Marchaim D., (2009).** Antimicrobial Drug Resistance, *Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 2*. pp 1213-1225.
- **McCormick JR, Flärdh K., (2012).** Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev*;36:206-31.
- **Mehrabani M, Kazemi A, Ayatollahi Mousavi, S.A., (2013).** Evaluation of anti-fungal activities of *Myrtus communis* L. by bioautography method, *Jun-dishapur J. Microbiol.* 61–7.
- **Meklat A., (2012).** Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba - Alger, 211p.
- **Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F., Ahmed Lebrihi. (2011).** Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in saharan soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol.*, 77: 6710–6714.
- **Mellouli L, Ben Ameer-Mehdi R, Sioud S, Salem M, Bejar S (2003).** Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a new isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res Microbiol* 154:345–352.
- **Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEPQ), (2008).** *Guide d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales : Cahier 8- Échantillonnage des matières dangereuses*, Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Édition courante.

- **Minnikin D. E., Alshamaony L. and Goodfellow M., (1975).** Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolsates. *J. Gen. Microbiol.*, **88**: 200-204.
- **Minnikin D.E. & Goodfellow M., (1981)** Lipids in the classification of actinomycetes. *Zbl. Bakteriol. Hyg. Suppl.* **11**: 99-109.
- **Mordarska H., Mordarska M., Goodfellow M. (1972).** Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *Journal of General Microbiology* , 71(1), 77–86.
- **Moreira KA, Albuquerque BF, Teixeira MFS, Porto ALF, Lima JL (2002)** Application of protease from *Nocardiopsis* sp. as a laundry detergent additive. *World J Microbiol Biotechnol* 18:307– 312.
- **Muylaert et Mainil J G., (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité », *Ann. Méd. Vét.*, **156**, 109- 123
- **Nguyen Minh Tri M., (2007).** Identification des Espèces de Moisissures, Potentiellement Productrices de Mycotoxines Dans le Riz Commercialise Dans Cinq Provinces de la Région Centrale du Vietnam - Etude des Conditions Pouvant réduire la Production des mycotoxines. Thèse de doctorat, INP Toulouse. France
- **Nikaido H (2009).** Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 119-146.
- **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.
- **O'Gara F., Dowling D.N., Boesten B. (2008).** Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs. John Wiley & Sons: Weinheim, P. 192.
- **Okami, Y., Hotta, K. (1988).** Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M, editors. *Actinomycetes in biotechnology*. New York: Academic Press, Inc; p.33-67.
- **Olsen S R, Cole C V, Watanabe F S, Dean L A., (1954).** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. - *U. S. Dep. Agric. Circ.*939, 19 p.
- **Ou X., Zhang B., Zhang L., Dong K., Liu C., Zhao G., Ding X. (2008).** SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.*, 40 (10), 877-882.
- **Pellet M et Laville- Timsit L. (1993).** Échantillonnage des sols pour caractérisation d'une pollution : Guide Méthodologique. Ministère de l'environnement, direction de l'eau. France.
- **Peltola J. S. P., Anderson M. A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R. M., Busse H. J., Salkinoja-Salonen M. S. and Rainey F. A. (2001).** Isolation of toxigenic *Nocardiopsis* strains from

indoor environments and description of two new *Nocardioopsis* species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischholae* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.*, **67**: 4293-4304.

- **Petrikkos, G., & Skiada, A. (2007).** *Recent advances in antifungal chemotherapy. International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 108–117.
- **Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2019).** Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida Species* From 1997–2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Supplement_1), S79 -S94. doi:10.1093/ofid/ofy358.
- **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2010).** Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme edition, p.1088.
- **Rahardjo Y.S.P., Tramper J., Rinzema A., (2006).** Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, **24**(2), 161-179.
- **Ranger J., (2015).** Les techniques de Contrôle Analytique adaptées à la lutte contre les médicaments de contrefaçon. Thèse de doctorat d'État en Pharmacie, Université de limoges. France.
- **Ranjani, A., Dhanasekaran, D., & Gopinath, P. M. (2016).** *An Introduction to Actinobacteria. Actinobacteria Basics and Biotechnological Applications.* doi:10.5772/62329.
- **Reggam A, Bouchelaghem H, Houhamdi M., (2015).** Qualité Physico-Chimique des Eaux de l'Oued Seybouse (Nord-Est de l'Algérie): Caractérisation et Analyse en Composantes Principales (Physico-chemical quality of the waters of the Oued Seybouse (Northeastern Algeria): Characterization and Principal Component Analysis), *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (5) (2015) 1417-1425.
- **Rheims H., Felske A., Seufert S. and Stackebrandt S., (1999).** Molecular monitoring of an uncultured group of the class *Actinobacteria* in two terrestrial environments. *Journal of Microbiol. Methods*, 36, 65-75.
- **Riedlinger J, Reicke A, Zähler HA, Krismer B, Bull AT, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bister B, Bischoff D, Süßmuth RD., (2004).** Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. *J Antibiot.* 57(4):271-279.
- **Rodriguez-Martinez J M., Velasco C., Briales A., Garcia I., Conejo M C., Pascual A., (2008).** Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 1240-1243.
- **Rollin-Pinheiro, R., Singh, A., Barreto-Bergter, E., & Del Poeta, M. (2016).** *Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. Future Medicinal Chemistry*, 8(12), 1469–1484.
- **Rouessac F., (1992).** Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. Masson & Cie Ed, Paris.

- **Sabaou N, Boudjella H, Bennadji A, Mostefaoui A, Zitouni A, Lamari L, Bennadji H (1998).** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse* 9(2):147–153.
- **Sabaou N., (1988).** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat En Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger. 192 p.
- **Saffroy S. (2006).** Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France. P. 150.
- **Saha S., Priyadharshini A., Dhanasekaran D., Thajuddin N., Chandraleka S., Chandramohan G. et Panneerselvam A., (2012).** Preclinical evaluation and molecular docking of 4-phenyl-1-Naphthylphenyl acetamide (4P1NPA) from *Streptomyces* sp. DPTB16 as apotent antifungal compound. *Comput. Bio. Med.*, 42 : 542–547.
- **Saker, R. (2015).** Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas.
- **Sanders E R., (2012).** Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods, *Journal of Visualized Experiments*. J. Vis. Exp. (63), e3064, doi:10.3791/3064.
- **Santo, R. D., Olsen, A. K., Pedersen, K., Costi, R., Cumming, P., & Jensen, S. B. (2010).** *[11C]-ROMAO - a potential new PET tracer for the MAO-A enzyme..* Abstract from 17th International Symposium on Radiopharmaceutical Science, Aachen.
- **Sasser M., (1990).** Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
- **Shetty, P. R., Buddana, S. K., Tatipamula, V. B., Naga, Y. V. V., & Ahmad, J. (2014).** Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 303–312. doi:10.1590/s1517-83822014005000022.
- **Shirling EB, Gottlieb D (1966).** Methods for characterization of Streptomyces species. *Int J Syst Bacteriol* 13:313–340
- **Shivabai C et Gutte S., (2019).** Isolation of actinomycetes from soil sample using different pretreatment methods and its comparative study. *International journal of research and analytical reviews*.6(2).697-702.
- **Simonart P. (1975).** Symposium sur les Méthodes d'étude microbiologique du Sol .Bulletin de la Société Belge de Pédologie.

- **Singhania R., Patel A., Thomas L., Goswami M., Giri B and Pandey A. (2015).** Industrial Enzymes. In Pandey et al, Industrial Biorefineries and White Biotechnology.
- **Smaoui S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France,P.251.
- **Souagui Y., (2015).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non polyéniques. Purification et caractérisation des molécules synthétisées. Thèse de doctorat, Université A. MIRA-Bejaia.
- **Srivibool R et Sukchotiratana M. (2006).** Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. Songklanakarin. *J. Sci. Technol.*, 28, 493-499.
- **Stackebrandt E et Goebel B. M. (1994).** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 846-849.
- **Stackebrandt E, Kroppenstedt RM, Jahnke KD, Kemmerling C, Qurther H (1994).** Transfer of *Streptosporangium viridogriseum* (Okuda *et al.* 1966), *Streptosporangium viridogriseum* subsp. *kofuensis* (Nonomura, Ohara, 1969), *Streptosporangium albidum* (Furumal *et al.* 1968) to *Kutzneria* gen. nov. as *Kutzneria viridogrisea* comb. nov., *Kutzneria kofuensis* comb. nov., *Kutzneria albida* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Streptosporangium*. *Int J Syst Bacteriol* 44:265–269.
- **Stackebrandt E., Lewis B. J. and Woese C. R., (1980).** The phylogenetic structure of the coryneform group of bacteria. *Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig. C 2* : 137-149.
- **Suarez S., (2013).** Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Thèse de Doctorat d'Etat, Université René Descartes Paris. France
- **Sujatha P, Bapi-Raju KVVSN, Ramana T (2005).** Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res* 160:119–126.
- **Tamura T, Nakagaito Y, Nishii T, Hasegawa T, Stackebrandt E, Yokota A., (1997).** A new genus of the Order *Actinomycetales*, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplanes caeruleus* (Horan and Brodsky 1986) comb. nov. and *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*;44:193-203.
- **Tan H, Deng Z, Cao L., (2009).** Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Lett Appl Microbio.* 49(2):248-253.

- **Thajuddin N, Muralitharan G, Dhanasekaran D, Muhammad Ilyas MH., (2015).** Microbial symbionts of plants. In: Plant Biology and Biotechnology (Bahadur et al., Eds), Springer, India.
- **Theilleux J. (1994).** Les actinomycetes. *In: Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel.* (Leveau, J.Y. and Bouix, M., Eds). Collection Sciences et Techniques agro-alimentaires.
- **Tiwari K., Gupta R.K. (2013).** Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39,256–294.
- **Touhtouh D., Moujahid Y., El Faleh E.M., EL Halimi R.E., (2014).** Caractérisations physicochimiques de trois types de sols du Sais, Maroc (Physicochemical characterizations of three types of soils of Sais, Morocco. *Journal of materials and environmental Science*.5 (5).1524-1534.
- **Toumatia O., (2015).** Etude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de doctorat, ENS Kouba. Algérie.
- **Tresner H. D., Hayes J. S. and Backus E. J., (1968).** Differential tolerance of Streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic tool. *Appl. Microbiol.* **16** : 1134-1136.
- **Venkateswarlu, K., Denning, D. W., Manning, N. J., & Kelly, S. L. (1995).** Resistance to fluconazole in *Candida albicans* from AIDS patients correlated with reduced intracellular accumulation of drug. *FEMS Microbiology Letters*, 131(3), 337–341.
- **Waksman S. A. (1950).** The Actinomycetes. Their nature, occurrence, activities, and importance. Chronica Botanica Company. Waltham, MA.
- **Wang, Y., et Jiang, Y. (2016).** Chemotaxonomy of Actinobacteria. Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.
- **Warren HB, Prokop JF, Grundy WE (1955).** Non-synthetic media for antibiotic producing actinomycetes. *Antib Chemother* 5:6–12.
- **Warwick S, Bowen T, McVeigh H, Embley TM (1994).** A phylogenetic analysis of the family *Pseudonocardiaceae* and the genera *Actinokineospora* and *Saccharothrix* with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*. *Int J Syst Bacteriol*; 44(2):293-9.
- **Williams S.T et Fleming I., (1989).** Spectroscopic methods in organic chemistry. Fourth edition. Mc Graw Hill book company, London, 264p.
- **Williams S.T. et Davies F.L., (1965).** Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.*, 38: 251-261.
- **Williams S.T., Sharpe M. E., and Holt J. G., (1989).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.4. Williams & Wilkins. Baltimore. U.S.A.

- **Williams, S.T., Davies, F.L. (1965).** Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J Gen Microbiol*, 38(2): 251–261.
- **Wuts, P. G. M., Simons, L. J., Metzger, B. P., Sterling, R. C., Slightom, J. L., & Elhammer, A. P. (2015).** Generation of Broad-Spectrum Antifungal Drug *Candidates* from the Natural Product Compound *Aureobasidin A*. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(6), 645-649.
- **Xiu, C., Jiang, Y., Li, Q., Han, L., & Jiang, C. (2016).** *Molecular Phylogenetic Identification of Actinobacteria. Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.*
- **Xu P, Li WJ, Tang SK, Zhang YQ, Chen GZ, Chen HH, Xu LH, Jiang CL., (2006).** *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp nov., a novel member of the family 'Oxalobacteraceae' isolated from China. *Int J Syst Evol Microbiol*;55:1149–53.
- **Yamaguchi T. (1965).** Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J Bacteriol.*, 89:444–453.
- **Yamamura, H., Hayakawa, M., Nakagawa, Y., Iimura, Y., (2003).** Species diversity of Nocardiae isolated from Lake and Moat sediment samples. *Actinomycetol.*, 17: 44-46.
- **Yoneyama, H., & Katsumata, R. (2006).** Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5), 1060–1075.
- **Zhang L. (2005).** Integrated approaches for discovering novel drugs from microbial natural product. *In* Zhang L and Demain A.L. *Natural products: drug discovery and therapeutic medicine.*(33-55). *Humana Press.*

Annexe 01 : Composition des milieux de cultures et les réactifs :

1- Préparation des réactifs (Wang et Jiang., 2016) :

Quatre réactifs sont nécessaires pour libérer, estérifier et extraire les acides gras des cellules vivantes.

<p>Réactif 1 Réactif de Saponification</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hydroxyde de sodium (Certifié ACS) 45 g - Méthanol (grade réactif) 150 ml - Eau distillée désionisée 150 ml - Ajouter de l'eau et du méthanol aux granulés NaOH en bouteille. Remuer jusqu'à dissolution des granulés de NaOH. 	<p>Réactif 2 Réactif de méthylation</p> <ul style="list-style-type: none"> - 12 N acide chlorhydrique 195 ml - Méthanol (grade réactif) 275 ml - Eau distillée désionisée 130 ml - Ajouter de l'acide à l'eau, puis au méthanol en remuant
<p>Solvant d'extraction du Réactif 3</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hexane (grade CLHP) 200 ml - Éther de méthyl-tert-butyle (qualité CLHP) 200 ml - 126 Actinobactéries-Bases et Applications Biotechnologiques - Ajouter le MTBE à l'hexane et remuer 	<p>Lavage de base du Réactif 4</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hydroxyde de sodium (ACS certifié) 10,8 g - Eau distillée désionisée 900 ml - Ajouter de l'eau aux granulés NaOH en bouteille. Remuer jusqu'à dissolution des granulés de NaOH.

Avertissement :

Les réactifs 1 et 2 sont caustiques, portent des lunettes de sécurité et des gants. Le méthyl-tert-butyl-éther est extrêmement inflammable. Éteindre toutes les flammes et les sources de chaleur avant d'utiliser. Poignée dans une hotte à fumée chimique.

La valeur de pH optimale en utilisant le système tampon suivant:

pH 4,0–5,0: acide citrique 0,1 M/citrate de sodium 0,1 M; pH 6,0–8,0: 0,1 M KH₂PO₄/0,1 M NaOH; pH 9,0–10,0: 0,1 M NaHCO₃/0,1 M Na₂CO₃; pH 11,0: 0,05 M Na₂HPO₄/0,1 M NaOH; pH 12,0–13,0: 0,2 M KCl/0,2 M NaOH (Xu *et al.*, 2006).

1X du tampon PCR contenant (Toumatia, 2015):

Le MgCl₂ (10 mM Tris-HCl pH 9; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1% Triton X-100; 0,2 mg mL⁻¹ BSA ou Bovine Serum Albumin), 200 µM du mélange désoxynucléoside triphosphate (dNTP) et 1,5 U de Taq ADN polymérase. L'amplification a été effectuée selon les conditions suivantes: dénaturation initiale de la matrice d'ADN à 98°C pendant 4 min, puis 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, hybridation à 52°C pendant 1 min et extension à 72°C pendant 2 min. A la fin des cycles, le mélange réactionnel a été maintenu à 72°C pendant 10 min pour l'élongation finale, puis refroidi à 4°C.

2- Composition des milieux de culture :

- Les milieux ISP (Shirling et Gottlieb, 1966):

Milieu ISP1

Agar, Extrait de Levure, Tryptone, pH 7,0 à 7,2

- Solution saline à l'état de traces: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, Eau distillée 1L.

Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1L; pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

Milieu ISP3

Farine d'avoine: 20 g; solution saline standard: 1 ml; agar: 20 g; eau distillée: 1000 mL. pH 7,2.

- Solution saline standard: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g; eau distillée: 1000 mL.

Milieu ISP4 Amidon: 10 g; K_2HPO_4 : 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2 g; CaCO_3 : 2 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 mL; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

Milieu ISP5 L-asparagine: 1 g; glycérol: 10 g; K_2HPO_4 anhydre: 1g; solution saline standard: 1ml (voir ISP3); eau distillée: 1 L; agar: 20 g. pH = 7,2.

Milieu ISP6: Peptone: 20 g; citrate ferrique ammoniacal: 0,5 g; K_2HPO_4 : 1 g; thiosulfate de sodium: 0,08 g; extrait de levure: 1 g; agar: 15 g; eau distillée: q.s.p. 1 L. pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

Milieu ISP7: Glycérol: 15 g; L-tyrosine: 0,5 g; L-asparagine: 1 g;

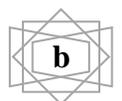
K_2HPO_4 : 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g; solution saline standard: 1 mL; agar: 18 g; eau distillée: q.s.p. 1L. pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

- Milieu SCA (Warren *et al.*, 1955):

Amidon : 10g; caséine : 0,3g; KNO_3 : 2g; NaCl : (50 ou 75g); K_2HPO_4 : 2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,05g; CaCO_3 : 0,02g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01g; glucose : 1 g ; Eau distillée : 1L. pH 7,2.

- Milieu Bennett (Warren *et al.*, 1955):

Glucose : 2g ; Extrait de levure : 1g ; Extrait de malt : 1g ; Peptone : 2g ; Agar : 20 g ; Eau distillée : 1L. pH 7,2.



- **Milieu "complex agar" = CA** (Chun *et al.*, 2000)

Peptone: 7,5 g; extrait de levure: 10 g; citrate de sodium: 3 g; MgSO₄, 7H₂O: 10 g; KCl: 2 g; FeSO₄, 7H₂O: 1 mL d'une solution à 4,98%; NaCl: 200 g; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1 L; pH = 7,2.

- **Les milieux d'isolement** (Jiang *et al.*, 2016):

- **Milieu Czapek amélioré** : Saccharose 20 g, NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 7H₂O 0,5 g, KCl 0,5 g, FeSO₄ 7H₂O 0,01 g, mélanges de vitamines [37] 3,7 mg, gélose 25 g, pH 7,2.

- **Milieu d'asparagine de glycérol** : L-asparagine 1 g, glycérol 10 g, K₂HPO₄ 1 g, mélanges de vitamines 3,7 mg, oligo-sel * 1 ml, gélose 20 g, pH 7,2–7,4.

- **Milieu farine d'avoine** : Farine d'avoine 20 g (cuire ou cuire à la vapeur 20 g de farine d'avoine dans 1000 ml d'eau distillée pendant 20 min, filtrer à travers un chiffon à fromage et ajouter de l'eau distillée pour ramener le volume de filtrat à 1000 ml), mélange de vitamines 3,7 mg, sels traces 1 ml, gélose 20 g, pH 7,2.

- **Caséine milieu** : Amidon soluble 10 g, caséine 0,3 g, KNO₃ 2 g, CaCO₃ 0,02 g, FeSO₄ 10 mg, mélanges de sel*, gélose 25 g, pH 7,2–7,4.

- **Milieu d'asparagine de glycérol** : (identique à ce qui précède), mélanges de sel*, gélose 25 g, pH 7,2–7,4.

- **Milieu extraits de sol** : Extraits de sol (sol 400 g, 120°C pendant 1 h, filtrer à travers un chiffon à fromage et ajouter de l'eau distillée pour ramener le volume de filtrat à 1000 ml), extraits de viande 3 g, peptone 5 g, mélanges de sel*, gélose 25 g, pH 7,2–7,5.

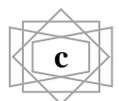
- **Milieu T3** : cellulose 10 g, caséine 0,3 g, KNO₃ 0,2 g, K₂HPO₄ 1 g, CaCO₃ 0,02 g, FeSO₄ 10 mg, salt mixtures*, agar 25 g, pH 7,5.

- **Milieu Horikoshi** : Glucose 10 g, extraits de levure 5 g, peptone 5 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 7H₂O 0,2 g, mélanges de sel*, gélose 25 g, pH 7,2–7,5.

- **Milieu d'extrait de levure d'eau** : Extrait de levure 0,25 g, K₂HPO₄ 0,5 g, gélose 18 g, pH 7,2.

- **Milieu de propionate de sodium** : propionate de sodium 1 g, L-asparagine 0,2 g, KH₂PO₄, 0,9 g, K₂HPO₄ 0,6 g, MgSO₄ 7H₂O 0,1 g, CaCl₂ 2H₂O 0,2 g, gélose 15 g, pH 7,2.

- **Milieu HV** : acide humique 1,0 g, Na₂HPO₄ 0,5 g, KCl 1,7 g, MgSO₄ 7H₂O 0,05 g, FeSO₄ 7H₂O 0,01 g, CaCl₂ 1 g, vitamines B (0,5 mg chacune de thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine, pantothénate de Ca, inositol, acide p-aminobenzoïque et 0,25 mg de biotine), gélose 18 g, pH 7,2.



Annexe 02 : Analyse de la séquence d'ADNr 16S (Xiu C *et al.*, 2016):

Le contig peut être assemblé par SeqMan comme dans les étapes suivantes :

1. Ouvrez SeqMan, cliquez sur "séquence" puis sur "ajouter", ajoutez les deux séquences au format ab1, cliquez sur "terminé".

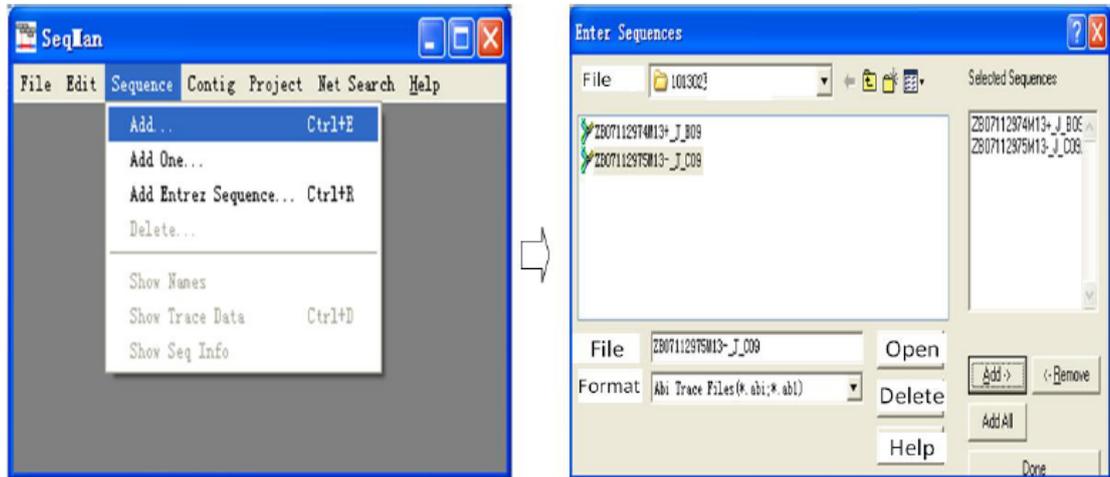


Figure: Ajouter une séquence à SeqMan.

2. Cliquez sur "assembler", double-cliquez sur le nom du fichier assemblé pour ouvrir le contig.

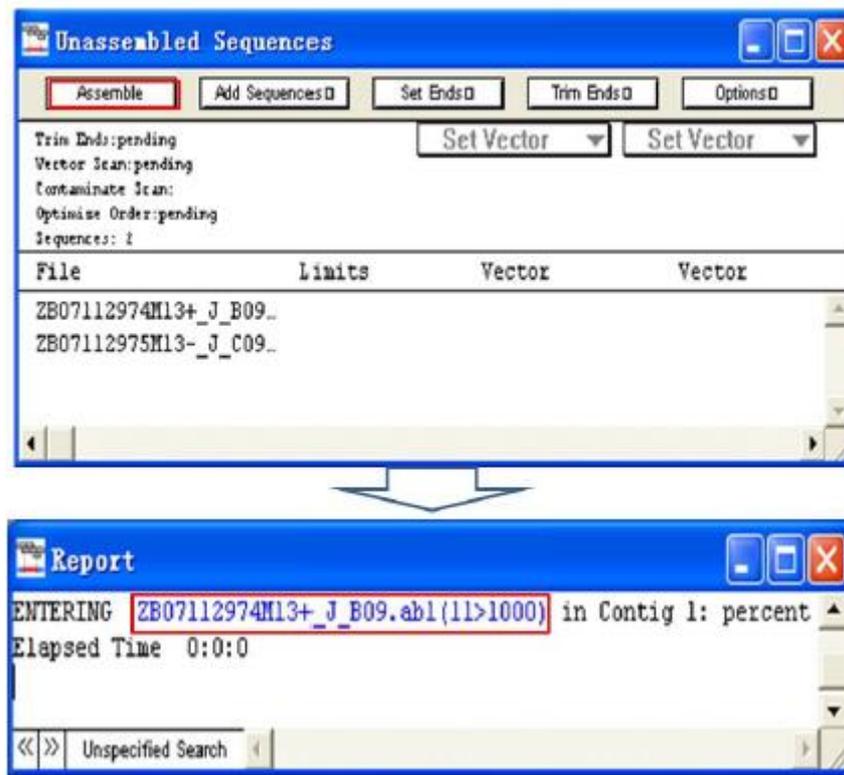


Figure: Séquence d'assemblage

3. Cliquez sur " ▼ " devant le nom du fichier pour voir la carte de qualité; il faut comparer la qualité de deux cartes et décider quelle base pourrait être utilisée si le consensus ne correspond pas parfaitement.

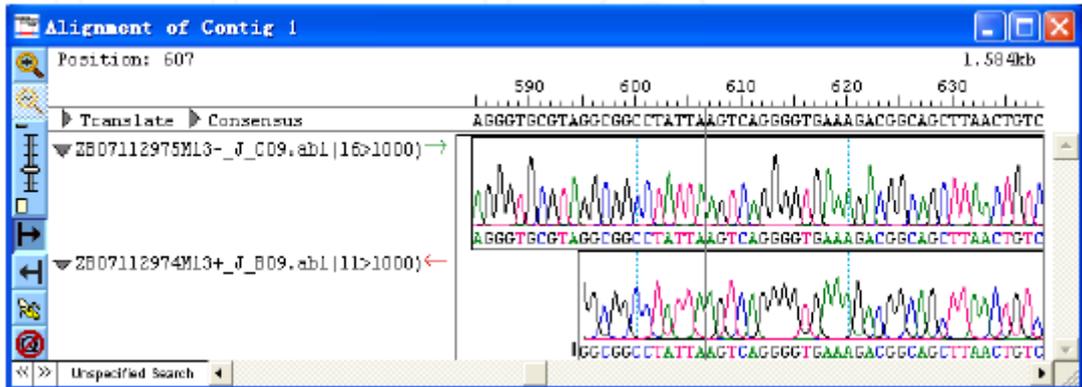
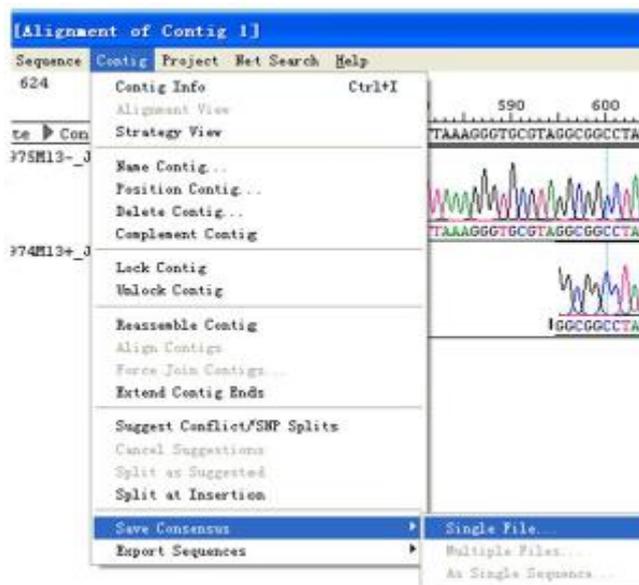


Figure: Vérifier la séquence assemblée

4. Cliquez sur "contig", puis sur "enregistrer le consensus" et "fichier unique" pour enregistrer le résultat.



Si le contig provient d'un clone, le vecteur doit être découpé comme suit:

- 1- Ouvrez la page web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) et collez séquence dans la fenêtre suivante, cliquez sur "Exécuter VecScreen".

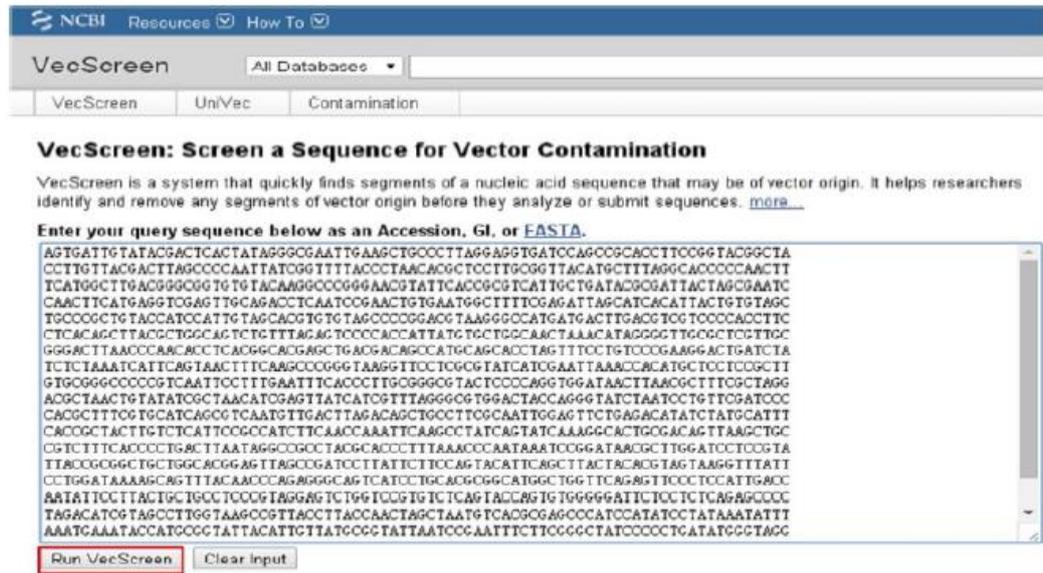


Figure: Exécuter vecscreen.

- 2- Voici le résumé graphique du rapport. Découpez la séquence appariée, c'est-à-dire que seule la séquence de 37-1, 584 pourrait être utilisée pour construire un arbre phylogénétique.

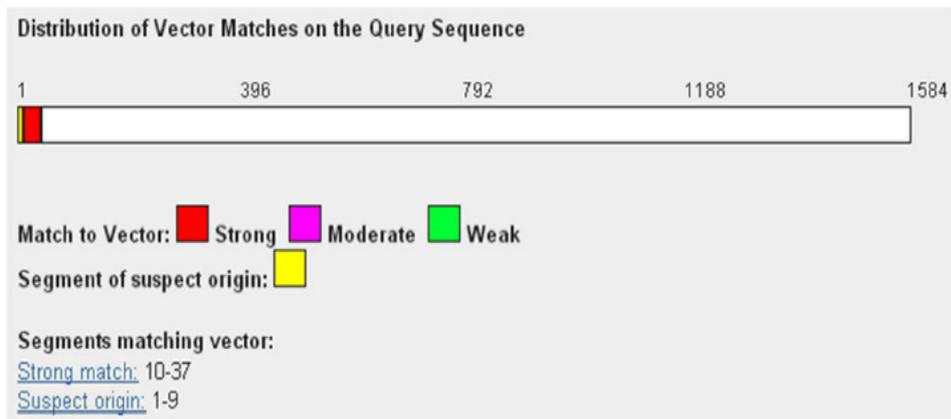


Figure : Le rapport de vecscreen