

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE
EL-HARRACH ALGER

THESE

Présentée

Par

M^{me} BOUDJELAL-BENCHEIKH Farida

En vue de l'obtention du titre de:

DOCTEUR en Sciences Agronomiques

**Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles
d'origine saharienne et caractérisation des composés
bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus* sp. AH97**

Soutenue publiquement le 28/ 11 /2012

devant le jury composé de:

M^r Z. BOUZNAD

Professeur (ENSA El Harrach)

Président

M^r N. SABAOU

Professeur (ENS Kouba)

Rapporteur

M^{me} M. LOUANCHI

Professeur (ENSA El Harrach)

Examinateur

M^r Y. KACI

Professeur (FSB/USTHB)

Examinateur

M^r A. ZITOUNI

Professeur (ENS Kouba)

Examinateur

Année Universitaire 2011/2012

*Je rends grâce à Dieu tout puissant pour sa miséricorde sans
lui rien n'aurait été possible.*

*A
Mes parents
Mon époux
Toute ma famille*

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens l'Ecole Normale Supérieure d'Alger (LBSM-ENS-Kouba) et au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS/INPT/UPS), au sein de l'équipe "Bioprocédés et Systèmes microbiens" de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INPT).

Qu'il me soit permis d'exprimer à Monsieur le Professeur Nasseridine SABAOU, ma sincère reconnaissance pour m'avoir dirigé dans ce travail pour ses précieux conseils, le dévouement, l'orientation, patience et pour ses remarques pertinentes et commentaires perspicaces. Qu'il accepte le témoignage de ma profonde gratitude.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à M. le Professeur Ahmed LEBRIHI, directeur de l'ENSAT-INPT de Toulouse pour son accueil bienveillant dans le cadre de la bourse BAF, pour l'intérêt qu'il a continuellement porté à ce sujet, pour ses précieux conseils et aide.

J'exprime ma profonde reconnaissance au professeur Florence MATHIEU, responsable du laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS/INPT/UPS) équipe "Bioprocédés et Systèmes microbiens" de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INPT), que je tiens à remercier vivement pour son soutien, sa gentillesse et ses encouragements.

Je remercie vivement le Pr Abdelghani ZITOUNI pour son aide si précieuse et conseils judicieux. Je le remercie également de me faire l'honneur de sa présence dans mon jury.

J'exprime ma gratitude envers le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche d'avoir financé ma formation en France.

J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur le Professeur Zouaoui BOUZNAD qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.

J'adresse mes vifs remerciements aux Professeurs, Madame Mériem LOUANCHI et Monsieur Yahia. KACI qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements aux personnes qui ont contribué à la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse: Messieurs Y. COPPEL (CNRS de Toulouse) pour les spectres RMN et F. PONT (INSERM Hôpital Purpan) pour les spectres de masse et la Responsable du service infra rouge (Université P. SABATIER de Toulouse) pour la spectroscopie infrarouge.

J'aimerais également exprimer mes vifs remerciements et amitiés à tous mes amis et collègues de laboratoire d'Alger et de Toulouse pour leur aide, leurs encouragements, leur soutien et la bonne ambiance de travail.

Je ne saurais remercier assez mon très cher époux pour sa compréhension, son soutien et ses encouragements.

Enfin, je remercie mes chers parents qui m'ont apporté le soutien moral. Leurs encouragements m'ont été une source inépuisable d'énergie et de volonté.

I. PUBLICATIONS

- 1- **Boudjelal F.**, Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2011). Taxonomy and antimicrobial activities of two novel halophilic *Saccharomonospora* strains isolated in Algerian Sahara soils. *Annals of Microbiology*. **61**: 299-305.
- 2- **Boudjelal F.**, Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2011). Production and partial characterization of antifungal and antibacterial activities of newly isolated moderately halophilic *Actinoalloteichus* strain AH97. *Brazilian Journal of Microbiology* **42**: 835-845.

II. COMMUNICATIONS

- 1- **Boudjelal F.**, Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. Caractérisation phénotypique et phylogénétique d'isolats d'actinomycètes halophiles d'origine saharienne. XIIIèmes Journées Nationales de Microbiologie, Société Algérienne de Microbiologie, Université Mentouri de Constantine, le 21 et 22 novembre 2006. Communication orale.
- 2- **Boudjelal F.**, Zitouni A., Mathieu F., Sabaou N. et Lebrihi A. Caractérisation phénotypique et phylogénétique d'isolats d'actinomycètes halophiles d'origine saharienne producteurs d'antibiotiques. Séminaire International « Journées Actinomycètes 2008 », les 12 et 13 Juin 2008, Toulouse, France. Communication orale.
- 3- Sabaou N., Zitouni A., Badji B., Boudjella H., Lamari L., Merrouche R., Meklat A., **Boudjelal F.**, Boubetra D. et Lebrihi A. Rétrospective sur les actinomycètes des sols sahariens et sur leurs antibiotiques. Colloque International sur les Biotechnologies « quelles biotechnologies pour les pays du Sud ». Université d'Oran Es-Sénia, le 24-25 novembre 2007. (communication orale).
- 4- Sabaou N., Zitouni A., Badji B., Boudjella H., Lamari L., Bouras N., Merrouche R., **Boudjelal F.**, Boubetra D., Meklat A., Riba A., Mokrane S., Mathieu F. et Lebrihi A. Recherche sur les actinomycètes des sols sahariens: taxonomie et antibiotiques. Séminaire International « Journées Actinomycètes 2008 », les 12 et 13 Juin 2008, Toulouse, France. Communication orale.
- 5- Sabaou N., Zitouni A., Badji B., Boudjella H., Lamari L., Bouras N., Merrouche R., **Boudjelal F.**, Boubetra D., Meklat A., Rachedi F. Z., Aouiche A., Yekkour A., Mathieu F. et Lebrihi A. (2010). Rétrospective sur les actinomycètes des sols sahariens: taxonomie, écologie et antibiotiques. Journées d'Etudes sur les Sciences de la Nature et de la Vie, les 06 et 07/12/10, Université de Béjaia.
- 6- Sabaou N., Zitouni A., Meklat A., **Boudjelal F.**, Boubetra D., Badji B., Boudjella H., Lamari L., Bouras N., Aouiche A., Z.Rachedi F., Belghit S., Khebizi N., Mathieu F. and Lebrihi A. (2011), "Bilan de recherche sur la taxonomie des actinomycètes des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces", Colloque sur « les nouvelles espèces végétales et microbiennes décrites en Algérie de 1962 à 2010 », du 18 au 20 octobre 2011, USTO, Oran.
- 7- Zitouni A., Drich E., Toumatia O., Badji B., Bakour L., Lamari L., Boudjella H., Bouras N., **Boudjelal F.**, Boubetra D., Merrouche R., Meklat A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N. (2009) - Valorisation de la biodiversité actinomycétale des écosystèmes sahariens par la recherche de nouvelles espèces et de nouveaux antibiotiques potentiellement intéressants dans les domaines agronomiques, alimentaires et pharmaceutiques. Congrès international: « biotechnologie microbienne au service du développement », *Microbiol, Université Cadi Ayyad, Marrakech 2-5/11/09* (Maroc). Communication orale.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

INDEX DES TABLEAUX

INDEX DES FIGURES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

RÉSUMÉS

INTRODUCTION GENERALE 1

Partie I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES ACTINOMYCETES HALOPHILES

I. TAXONOMIE DES ACTINOMYCETES..... 5

1. Classification supra-générique..... 5

2. Critères morphologiques..... 5

2.1. Caractéristiques macromorphologiques..... 5

2.2. Caractéristiques micromorphologiques 9

3. Critères chimiques (chimiotaxonomie) 9

3.1. Acide diaminopimélique et autres acides aminés 9

3.2. Glucides cellulaires..... 12

3.3. Lipides membranaires et pariétaux..... 12

3.3.1. Les phospholipides 13

3.3.2. Les acides gras..... 13

3.3.3. Les acides mycoliques..... 13

3.3.4. Les ménaquinones 15

4. Clé d'identification des genres..... 15

5. Critères d'identification des espèces..... 15

5.1. Caractéristiques physiologiques..... 15

5.2. Caractéristiques moléculaires..... 15

5.2.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S..... 17

5.2.2. Hybridation ADN/ADN..... 18

II. ACTINOMYCÈTES HALOPHILES ET HALOTOLERANTS..... 19

1. Halophilie et halotolérance..... 19

2. Position taxonomique des actinomycètes halophiles et halotolérants..... 20

2.1. Position taxonomique des genres halophiles parmi les différentes familles..... 20

2.2. Espèces halophiles..... 20

2.2.1. Famille des *Nocardiopsaceae*..... 22

2.2.1.1. Espèces du genre <i>Nocardiopsis</i>	22
2.2.1.2. Espèces du genre <i>Streptomonospora</i>	25
2.2.1.3. Espèce du genre <i>Thermobifida</i>	25
2.2.1.4. Espèce du genre <i>Haloactinospora</i>	25
2.2.2. Famille des <i>Pseudonocardiaceae</i>	25
2.2.2.1. Espèces du genre <i>Saccharomonospora</i>	25
2.2.2.2. Espèces du genre <i>Saccharopolyspora</i>	25
2.2.2.3. Espèces du genre <i>Prauserella</i>	28
2.2.3. Famille des <i>Actinopolysporaceae</i>	28
2.2.3.1. Espèces du genre <i>Actinopolyspora</i>	28
2.2.3.2. Espèces appartenant à d'autres Genres.....	28
III. APERÇU SUR L'ÉCOLOGIE DES ACTINOMYCETES	28
1. Actinomycètes en général.....	28
2. Actinomycètes halophiles.....	30
3. Mécanisme d'adaptation aux conditions salines.....	30
IV. IMPORTANCE BIOTECHNOLOGIQUE DES ACTINOMYCETES HALOPHILES ET NON HALOPHILES	31
1. Domaines pharmaceutiques: production d'antibiotiques et d'autres substances bioactives.....	31
2. Production d'enzymes.....	32
3. Production de biosurfactants.....	33
4. Production d'osmorégulateurs ou de solutés compatibles.....	34
5. Production de bioplastics et d'exopolysaccharides.....	34
6. Utilisation des actinomycètes halophiles dans la bioremédiation.....	35
7. Utilisation des actinomycètes dans le domaine agronomique.....	35
V. ANTIBIOTIQUES ET ACTINOMYCETES PRODUCTEURS	36
1. Aperçu sur l'histoire des antibiotiques.....	36
2. Classification des antibiotiques.....	37
2.1. Classification d'après la structure chimique.....	37
2.2. Autres classifications.....	37
2.3. Microorganismes producteurs d'antibiotiques.....	39
2.3.1. Actinomycètes.....	39
2.3.2. Bactéries non mycéliennes.....	39
2.3.3. Champignons.....	40

3. Production, purification et identification des antibiotiques.....	40
3.1. Production.....	40
3.2. Purification.....	41
4. Mode d'action des antibiotiques.....	42
4.1. Action sur la membrane plasmique.....	42
4.2. Inhibition de la synthèse de la paroi.....	42
4.3. Inhibition de la synthèse des protéines.....	42
4.4. Inhibition de la synthèse des acides nucléiques.....	43
4.5. Autres activités.....	43
5. Résistance aux antibiotiques et intérêt de la recherche de nouveaux antibiotiques.....	43
5.1. Les antibactériens.....	43
5.2 Les antifongiques.....	44

PARTIE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. LES MICROORGANISMES.....	46
1. Les souches d'actinomycètes halophiles.....	46
2. Les microorganismes-cibles.....	46
 II. ETUDE TAXONOMIQUE DES ACTINOMYCETES HALOPHILES.....	 47
1. Étude morphologique.....	47
1.1. Caractéristiques culturelles.....	47
1.2. Caractéristiques micromorphologiques.....	47
2. Étude chimique des constituants cellulaires.....	47
2.1. Détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et détection de la glycine.....	48
2.2. Mise en évidence des sucres.....	48
2.3. Analyse des lipides.....	49
2.3.1. Analyse des phospholipides membranaires.....	49
2.3.2. Analyse des acides gras.....	49
2.3.2.1. Extraction des acides gras.....	49
2.3.2.2. Détection des acides gras.....	49
3. Etude physiologique.....	50
3.1. Détermination de la concentration de NaCl optimale pour la croissance.....	50
3.2. Production de nitrate réductase.....	51
3.3. Tests de dégradation de divers composés organiques.....	51

3.4. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques.....	51
4. Etude moléculaire des actinomycètes halophiles.....	51
4.1. Extraction de l'ADN génomique.....	51
4.2. Quantification de l'ADN.....	52
4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	53
4.4. Amplification par PCR.....	53
4.5. Séquençage de l'ADNr 16S.....	54
4.6. Analyses phylogénétiques.....	54

III. ACTIVITES ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES SUR MILIEU SOLIDE

IV. PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE AH97..... 55

1. Souche d'actinomycète AH97.....	55
2. Souches de microorganismes-cibles.....	55
3. Mise en évidence de l'activité antibiotique de la souche AH97.....	56
3.1. Mise en évidence sur milieux solides.....	56
3.2. Production des composés actifs en milieux liquides.....	56
3.2.1. Cinétique de production des substances actives.....	56
3.2.2. Production des composés actifs en quantité appréciable.....	57
3.3.- Extraction des composés actifs et antibiographie.....	57
3.3.1. Extraction des composés actifs.....	57
3.3.1.1. Extraction à partir des filtrats de culture.....	58
3.3.1.2. Extraction à partir du mycélium.....	58
3.3.2. Antibiographies et choix du solvant d'extraction.....	58
3.4. Mise en évidence des composés actifs par bioautographie.....	60
3.4.1-Préparation des plaques de gel de silice.....	60
3.4.2. Systèmes de solvants.....	60
3.4.3. Développement des plaques.....	60
3.4.4. Révélations microbiologiques ou bioautographies.....	60
3.5. Révélations chimiques des composés actifs.....	61
3.6. Semi-purification des composés actifs.....	61
3.7. Purification finale des composés actifs par HPLC.....	62
3.7.1. Appareillage.....	62
3.7.2. Conditions expérimentales.....	62

3.8. Etudes spectroscopiques des antibiotiques.....	63
3.8.1. Spectroscopie UV-visible.....	63
3.8.2. Spectroscopie Infra-Rouge.....	63
3.8.3. Spectrométrie de masse.....	64
3.8.4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton.....	64

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES HALOPHILES 65

CHAPITRE I

ETUDE TAXONOMIQUE ET MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ANTIBIOTIQUES DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES HALOPHILES DU GROUPE G1

I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS DU GENRE *NOCARDIOPSIS*

1. Résultats.....	67
1.1. Détermination du genre.....	67
1.1.1 Étude morphologique.....	67
1.1.1.1. Caractéristiques culturelles.....	67
1.1.1.2. Caractéristiques micromorphologiques.....	67
1.1.2. Analyse chimique des constituants cellulaires.....	67
1.1.3. Identification du genre.....	69
1.2. Détermination des espèces.....	69
1.2.1. Etude physiologique des <i>Nocardiosis</i>	69
1.2.2. Etude moléculaire.....	78
1.2.2.1. Séquençage de l'ADNr 16S.....	78
1.2.3. Identification des espèces.....	78
2. Discussion.....	78
3. Conclusion.....	86

II. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE SUR MILIEUX SOLIDES

1. Résultats.....	87
2. Discussion.....	89
3. Conclusion.....	91

CHAPITRE II

ETUDE TAXONOMIQUE ET MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ANTIBIOTIQUES DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES HALOPHILES DU GROUPE G2

I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS DU GENRE <i>STREPTOMYCES</i>.....	92
1. Résultats.....	92
1.1. Détermination du genre.....	92
1.1.1 Étude morphologique.....	92
1.1.1.1. Caractéristiques culturelles.....	92
1.1.1.2. Caractéristiques micromorphologiques.....	92
1.1.2 Etude chimiotaxonomique.....	92
1.1.3. Identification du genre.....	94
1.2. Détermination des espèces.....	94
1.2.1. Etude physiologique.....	94
1.2.2. Etude moléculaire.....	94
2. Discussion.....	96
3. Conclusion.....	98
II. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE SUR MILIEUX SOLIDES	
1. Résultats.....	98
2. Discussion.....	100
3. Conclusion.....	100

CHAPITRE III

ETUDE TAXONOMIQUE ET MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ANTIBIOTIQUES DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES HALOPHILES DU GROUPE G3

I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS DU GENRE <i>SACCHAROMONOSPORA</i>	
1. Résultats.....	101
1.1. Détermination du genre.....	101
1.1.1 Étude morphologique.....	101
1.1.1.1. Caractéristiques culturelles.....	101
1.1.1.2. Caractéristiques micromorphologiques.....	101
1.1.2 Etude chimiotaxonomique.....	101
1.1.3. Identification du genre.....	101
1.2. Détermination des espèces.....	103
1.2.1. Etude physiologique.....	103
1.2.2. Etude moléculaire.....	103
1.2.2.1. Séquençage de l'ADNr 16S.....	103
2. Discussion.....	106

3. Conclusion.....	108
II. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE SUR MILIEUX SOLIDES	108
1. Résultats.....	108
2. Discussion.....	108
3. Conclusion.....	110

CHAPITRE IV

ETUDE TAXONOMIQUE DE L'ISOLAT AH97 DU GROUPE G4 ET PRODUCTION DE COMPOSES BIOACTIFS

I. ÉTUDE TAXONOMIQUE DE L'ISOLAT AH97 DU GROUPE G4.....	111
1. Résultats.....	111
1.1. Détermination du genre.....	111
1.1.1 Étude morphologique.....	111
1.1.1.1 Caractéristiques culturelles.....	111
1.1.1.2. Caractéristiques micromorphologiques.....	111
1.1.2. Étude chimiotaxonomique.....	111
1.1.3. Identification du genre.....	111
1.2. Détermination de l'espèce.....	112
1.2.1. Étude physiologique.....	112
1.2.2. Étude moléculaire: séquençage de l'ADNr 16S et phylogénie.....	112
1.2.3. Identification de l'espèce.....	112
II. PRODUCTION DE COMPOSES BIOACTIFS PAR L'ISOLAT AH97.....	117
1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	117
1.1. Mise en évidence sur milieu solide.....	117
1.2.. Cinétique de croissance et de production en milieu TSB.....	117
III. EXTRACTION, DÉTECTION ET PURIFICATION DES COMPOSES BIOACTIFS DE L'ISOLAT AH97.....	120
1. Résultats.....	120
1.1. Extraction des composés bioactifs.....	120
1.1.1. Extraction à partir du mycélium.....	120
1.1.2. Extraction à partir du filtrat de culture.....	120
1.2. Détection des composés bioactifs par bioautographie.....	122

1.3. Purification des composés bioactifs.....	122
1.3.1. Semi-purification des composés bioactifs.....	122
1.3.2. Purification des antibiotiques par HPLC.....	122
1.4. Caractérisation partielle des substances bioactives F1 et F2.....	127
1.4.1. Révélations chimiques.....	127
1.4.2. Spectroscopie en UV-visible.....	127
1.4.3. Spectroscopie infrarouge.....	129
1.4.4. Spectrométrie de masse.....	131
1.4.5. Spectrométrie RMN.....	131
2. Discussion.....	131
3. Conclusion.....	132
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	140
ANNEXES.....	163

INDEX DES TABLEAUX

	Pages
Tableau 1. Familles et genres de l'Ordre des <i>Actinomycetales</i> (Stackebrandt et Schumann, 2006), actualisée par des données bibliographiques récentes (Goodfellow et Fiedler, 2010 et Euzéby 2011).	7
Tableau 2. Types d'acides gras retrouvés chez les différents genres d' <i>Actinomycetales</i> (Kroppenstedt et Eventushenko, 2006).	14
Tableau 3. Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes basée sur les critères chimiques et morphologiques.	16
Tableau 4. Classification des microorganismes en fonction de leur tolérance au NaCl (Kushner, 1978).	21
Tableau 5. Classification des bactéries halotolérantes selon Larsen (1986).	21
Tableau 6a. Liste des espèces d'actinomycètes halophiles et halotolérantes de l'Ordre des <i>Actinomycetales</i> et de la famille des <i>Nocardiopsaceae</i> .	23
Tableau 6b. Liste des espèces d'actinomycètes halophiles de l'Ordre des <i>Actinomycetales</i> , appartenant aux familles des <i>Pseudonocardiaceae</i> , <i>Actinopolysporaceae</i> , <i>Glycomycetaceae</i> et <i>Jiangellaceae</i> .	27
Tableau 6c. Liste de quelques espèces d'actinomycètes halotolérantes de l'Ordre des <i>Actinomycetales</i> , appartenant à la famille des <i>Streptomycetaceae</i> et au genre <i>Streptomyces</i> (Pridham et Tresner, 1974).	29
Tableau 7. Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Bérdy <i>et al.</i> , 1987).	38
Tableau 8. Caractéristiques culturelles des 43 isolats d'actinomycètes halophiles.	66
Tableau 9. Caractéristiques culturelles des 35 isolats du genre <i>Nocardiopsis</i> .	68
Tableau 10. Composition en acide gras des isolats d'actinomycètes halophiles du groupe G1.	70
Tableau 11. Croissance des isolats de <i>Nocardiopsis</i> en présence de différentes concentrations de NaCl.	71
Tableau 12. Croissance des isolats de <i>Nocardiopsis</i> à différents pH et températures.	73
Tableau 13. Dégradation de divers composés organiques et d'acides aminés par les isolats d'actinomycètes halophiles du genre <i>Nocardiopsis</i> .	74
Tableau 14. Dégradation des acides organiques par les isolats d'actinomycètes halophiles du genre <i>Nocardiopsis</i> .	75
Tableau 15. Dégradation des sucres et dérivés par les isolats d'actinomycètes halophiles du genre <i>Nocardiopsis</i> .	76

Tableau 16. Croissance en présence de lysozyme, production de nitrate réductase et résistance aux antibiotiques des isolats d'actinomycètes halophiles du genre <i>Nocardiopsis</i> .	77
Tableau 17. Pourcentages de similarités des isolats d'actinomycètes du groupe G1 avec les espèces les plus proches de <i>Nocardiopsis</i> ,	79
Tableau 18. Caractéristiques physiologiques distinctives des isolats de <i>Nocardiopsis</i> du premier et du deuxième clade, et de l'isolat AH24, en comparaison avec les souches-types des espèces de <i>Nocardiopsis xinjiangensis</i> YIM 90004 ^T (<i>N. x.</i>), <i>N. litoralis</i> JSM 073097 ^T (<i>N. l.</i>) et <i>N. kunsanensis</i> KTC98 31 ^T (<i>N. k.</i>).	83
Tableau 19. Caractéristiques distinctives entre la souche AH37 et l'espèce la plus proche, <i>Nocardiopsis terrae</i> YIM 90022 ^T (clade 4).	85
Tableau 20 Activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes halophiles du genre <i>Nocardiopsis</i> contre divers microorganismes.	88
Tableau 21. Caractéristiques culturelles des cinq isolats d'actinomycètes halophiles du groupe G2.	93
Tableau 22. Caractéristiques physiologiques des isolats du genre <i>Streptomyces</i> .	95
Tableau 23. Caractéristiques physiologiques distinctives des isolats de <i>Streptomyces</i> en comparaison avec les espèces phénotypiquement apparentées.	97
Tableau 24. Activité antimicrobienne des isolats de <i>Streptomyces</i> AH21, AH27, AH 28, AH30 et AH40 contre divers microorganismes.	99
Tableau 25. Caractéristiques culturelles des isolats du groupe G1.	102
Tableau 26. Caractéristiques physiologiques des isolats AH10 et AH35.	104
Tableau 27. Caractéristiques physiologiques de <i>Saccharomonospora</i> AH35 et AH10 en comparaison avec <i>Saccharomonospora paurometabolica</i> , <i>S. iraqiensis</i> " et <i>S. halophila</i> .	107
Tableau 28. Activité antimicrobienne des isolats AH10 et AH35 contre divers microorganismes.	109
Tableau 29. Caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'isolat AH97.	113
Tableau 30. Caractéristiques physiologiques et chimiotaxonomiques distinctifs entre l'isolat AH97 et la souche-type d' <i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i> HPA177 ^T .	116
Tableau 31. Activité antimicrobienne de l'isolat AH97 contre divers microorganismes-cibles.	118
Tableau 32. Origine des isolats.	163

INDEX DES FIGURES

	Pages
Figure 1. Classification supra-générique des actinobactéries (Goodfellow et Fiedler, 2010).	6
Figure 2. Dendrogramme montrant les relations phylogéniques entre les différentes familles de la classe des actinobactéries, établi sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S (Kämpfer, 2010).	8
Figure 3. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes (Sabaou, 1988).	10
Figure 4. Micromorphologie de quelques espèces d'actinomycètes appartenant à différents genres.	11
Figure 5. Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre la majorité des espèces de <i>Nocardioopsis</i> , établi sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S.	24
Figure 6. Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre les différentes espèces de <i>Saccharomonospora</i> et <i>Prauserella</i> établi sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S.	28
Figure 7. Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre les différentes espèces de <i>Actinopolyspora</i> , établi sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S.	28
Figure 8. Protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques de l'isolat AH97.	59
Figure 9. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les 24 isolats d'actinomycètes du groupe G1 et les souches-types des espèces du genre <i>Nocardioopsis</i> .	80
Figure 10. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les isolats AH35 et AH10 avec les souches-types des espèces du genre <i>Saccharomonospora</i> .	105
Figure 11. Arbre phylogénique basée sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat AH97 et les souches-types des espèces du genre <i>Actinoalloteichus</i> .	114
Figure 12. Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques en milieu TSB contenant 5% de NaCl.	119
Figure 13. Activités des extraits du filtrat de culture de l'isolat AH97 par différents solvants organiques.	121
Figure 14. Localisation des activités antibiotiques par bioautographie de l'extrait organique.	122
Figure 15a. Profils d'élution en HPLC de la première injection de la fraction active TM2 semi-pure solubilisé	

dans du MeOH.	124
Figure 15b,c. Profils d'élution en HPLC des dernières injections et purification totale des composés actifs.	125
Figure 16. Spectre d'absorption dans UV-visible	127
Figure 17a. Spectre d'absorption dans l'infra rouge du composé F1 produit par l'isolat AH 97.	128
Figure 17b. Spectre d'absorption dans l'infra rouge du composé F2 produit par l'isolat AH 97.	128
Figure 18. Spectre de masse du composé F1	129
Figure 19a. Spectre ¹ H RMN du composé bioactif F1 dans de l'eau deutériée (D ₂ O).	129
Figure 19b. Spectre ¹ H RMN du composé bioactif F2 dans du méthanol deutériée (MeOD).	130
Figure 20. Structure chimique du dioctylphtalate (Sigma Aldrich, 2011).	132

LISTE DES ABREVIATIONS

A.M.	Acétate d'éthyle- méthanol	KBr	Bromure de potassium
ATTC	American Type Culture collection	Tr	Temps de rétention
B.A.E.	<i>n</i> -Butanol-acide acétique-eau	TSA	Trypticase-Soja Agar
BLAST	Basic Local Aligement Search Tool	TSB	Trypticase Soy Broth
BET	Bromure d'éthyidium	TAE 1X	Tris-acétate, EDTA
BLSE	β - lactamase à spectre étendu	MA	Mycélium aérien
CCM	Chromatographie sur couche mince	MeOH	Méthanol
CPG	Chromatographie en phase gazeuse	MHz	Méga Hertz
CIP	Collection de l'Institut Pasteur	MS	Mycélium du substrat
CMA	Milieu complexe agar	NCBI	National Center for Biotechnology Information
D.A.P	Diaminopimelic acid	NRRL	Northern Regional Research Center
DMSO	Diméthylsulfoxyde	PS	Pigment soluble
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate	Rf	Rapport frontal
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique	PCR	Polymerase Chain Reaction
FAME	Fatty Acid Methyl Ester	PC	Phosphatidylcholine
ICAAC	Interscience Conférence on Antimicrobial Agents and Chemotherapy	PE	Phosphatidyl éthanolamine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
IR	Infra Rouge	Rpm	Rotation par minute
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project		

RESUME

Une étude taxonomique de 43 isolats d'actinomycètes halophiles provenant de différents échantillons de sols salés sahariens a été entreprise du point de vue phénotypique et phylogénétique.

Cette analyse a été effectuée en utilisant une approche polyphasique incluant une étude morphologique (macro et micromorphologique), une étude chimiotaxonomique (analyse des constituants cellulaires), une étude physiologique et une étude moléculaire basée sur le séquençage de l'ADNr 16S (avec étude phylogénétique).

Sur la base des analyses morphologique et chimique, 35 isolats ont été rattachés au genre *Nocardiopsis*, deux au genre *Saccharomonospora*, cinq au genre *Streptomyces* et un au genre *Actinoalloteichus*.

Plusieurs isolats appartenant aux genres *Nocardiopsis*, *Saccharomonospora* et *Actinoalloteichus* ont fait l'objet d'une étude moléculaire, après extraction de l'ADN, amplification par PCR et séquençage de l'ADNr 16S. Les résultats du séquençage ont permis de confirmer l'appartenance des isolats aux trois genres sus-cités.

Une étude détaillée a permis l'obtention de dendrogrammes phylogénétiques montrant la position des isolats sahariens par rapports aux espèces connues dans le monde. Neuf isolats de *Nocardiopsis*, un de *Saccharomonospora* et un d'*Actinoalloteichus* forment des lignées phylétiques distinctes suggérant la présence de onze espèces nouvelles.

Toutes les souches d'actinomycètes halophiles sont douées d'activités antibiotiques (antibactérienne et antifongique) contre plusieurs germes pathogènes. Les souches les plus intéressantes sont celles actives contre les microorganismes pathogènes ou toxigènes, tels que *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus*.

La souche d'*Actinoalloteichus* a montré une forte activité antibactérienne et antifongique et a été retenue pour une étude plus approfondie. Des cinétiques de production des antibiotiques ont été entreprises, suivies de l'extraction (par des solvants organiques) et de la purification (par chromatographie sur couches minces et par HPLC) des molécules actives. Deux produits bioactifs ont fait l'objet d'études spectroscopiques telles que l'UV-visible, l'infra-rouge et la RMN du proton, ainsi que la spectrométrie de masse. Les résultats ont montré la présence d'un antibiotique hydrophile appartenant à la famille des aminosides et d'un composé actif hydrophobe appartenant à la famille des aromatiques et identifié au dioctyl phtalate.

Mots clés: Actinomycètes halophiles, sol salé saharien, étude phénotypique et phylogénétique, production de molécules actives.

ABSTRACT

A taxonomic study of forty-three halophilic actinomycetes isolated from different Saharan salted soil samples were studied phenotypically and phylogenetically. This analysis was performed by using a polyphasic approach including morphological (macro- and micro-morphological), a chemotaxonomic study (analysis of cellular components), a physiological and molecular studies based on sequencing of 16S rDNA (with phylogenetic study). Based on morphological and chemical analyses, 35 isolates were related to the genus *Nocardiopsis*, two isolates to the genus *Saccharomonospora*, five to the genus *Streptomyces*, and one to the genus *Actinoalloteichus*.

The molecular study (DNA extraction, PCR amplification and sequencing of 16S rDNA) of several isolates belonging to the genera *Nocardiopsis*, *Saccharomonospora* and *Actinoalloteichus* have been realized. The sequencing results confirmed that the the isolates belonging to the three genera mentioned above. A detailed study has allowed us to obtain a phylogenetic dendrogram showing the position of Saharan isolates compared to known published species. Nine isolates belonging to *Nocardiopsis*, one *Actinoalloteichus*, one *Saccharomonospora*, represent a distinct phylogenetic lineages, suggesting the presence of eleven new species. The antibiotic activities (antibacterial and antifungal) of all isolated halophilic actinomycetes have been studied against several pathogen microorganisms. The most promising strains are those active against pathogenic or toxigenic microorganisms, including *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. Moreover, the *Actinoalloteichus* isolate showed strong antibacterial and antifungal activities, and consequently was selected for further study. The first results, after purification by HPLC and spectroscopic studies showed the presence of several hydrophilic (aminoglycosides) and hydrophobic (aromatic) antibiotics.

The bioactive compounds were extracted from the culture filtrate with *n*-butanol and purified using thin layer chromatography (TLC) and high pressure liquid chromatography (HPLC) procedures. Two active fractions were obtained: hydrophilic (F1) and hydrophobic (F2) compounds. Ultraviolet-visible, infrared, ¹H nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy studies suggested that these molecules were an aminosidic (F1) and the dioctyl phthalate (F2) compounds.

Keywords: halophilic actinomycetes, salty soils, Sahara, phenotypic and phylogenetic taxonomy, antibiotic production.

ملخص

تم تلقي ابد درس (تصنيفية) من اجل ب المظري والجزئي (ل)-: 43 عزلة من البكتيري التي في اقم حبة ذلك لموحه
صدرها عدة عينات من لتربة ال ملحة للصحراري.

أجريت هذه التحليلات لبلت عمال لطبقه تتم عدة المراحل التي تشمل دراسته كليله للخصائص استثنائية
لشوكليله لائقه (، دراسة ليهي قضييه بلحجيل للمكونات الخبيثة (، دراسته قضييه طوجيه ودراسة جزئية
با. علم على تعديت سلسل ADN ليهي وزومي 16S) مع دراسة أشجار للنسب "phylogénétique".

بالاضام ادعى التحليل للشوكليله واليهي قضييه، ألحقت 35 عزلة قبل جنس *Nocardia*، نبت انبال جنس
Saccharomonospora خمس قبل جنس *Streptomyces* و واحد قبل جنس *Actinoalloteichus*.
عدة عزلات قضييه للأجناس *Nocardia*، *Saccharomonospora* و *Actinoalloteichus*
كانت محل دراسة جزئية قبع عداست خلاص ال- ADN، الأثار بتلف اعلم تسلسل لي للوهي مري PCR وتحييد
تسلسل ADN ليهي وزومي 16S. تتعلمت سلسل س محتمل أكيد من تلك يدي لتماء العزلات للأجناس
المذكورة أعلاه.

لدراسه مفصلة س محتمل حصول على أشجار للنسب التي تظهر موقع العزلات للصحراري فلين سبه
للأنواع المعرفه في العلم بتسبع عزلات من *Nocardia*، واحدة من *Saccharomonospora* و
واحدة من *Actinoalloteichus* تشكل سلالا تنسبت وحي ووضوح بل متشابهة لحدى عشر رنوع اجدي دا.

كل سلالا البكتيري الوافيه ال ملحة لموح قتمت على شطقتض ادحيوي (ضادة للبكتيري الوافطري ات) تجاه
عدة جزييم ممرضة. السلالا الأثر أهميه هي تلك لظن شطة ضد بعض الكائنات الدقيقة الممرضة
والتي حدها لس موم، نحل *Salmonella enterica*، *Klebsiella pneumoniae*، *Enterococcus*

Serratia marcescens، *Aspergillus flavus* و *Aspergillus ochraceus*.

سلالة *Actinoalloteichus* أظهرت نشاطا قويا ضادا للبكتيري الوافطريات ولتكت ميثاق أوهال دراستها
بشكل أعمق. تم إجراء دراسة حكيه لإنتاجها للضادات المحيويه، وبتعت الدراسة بالامتصاص
بالميات الحضرية (ولتيه بكروم و موعرفي اطلب لقرقي قة "CCM" والكروم و موعرفي السط لثقاقه
تتحليله "HPLC") للجزئيات النشطة حيوي اتم اختيار مركبين نشطين حيوي لأجراء الدراسات الوصفية
التي فوق الكيفس جي- المروي، الأشعة تحت الحمراء ولرئين الموعرفي للنووي للبروتينات بالإضافة
لطي الفلورة). أظهرت النتائج وجود ضاد حيوي محتمل اعيت ميل عالية الأين ويدات ومركب آخر كاره
للم اعيت ميل لعل العطريات وعرف غي أنه يولقي لفتالات.

الكلمات المفتاحية: بكتيري اي في حبة للموحه لتربة صحراريه ملحة، دراسة مظري تجزييه، لتاج
الضادات الحيويه.

INTRODUCTION GENERALE

Les milieux salés et hypersalés sont connus comme étant des écosystèmes extrêmes dans lesquels la diversité bactérienne est faible (Brock, 1979). Ces systèmes sont caractérisés par l'absence de plusieurs formes de vie (environnement hostile au développement des formes courantes) et hébergent une microflore autochtone particulière et adaptée à ces habitats.

Les microorganismes trouvés dans ces environnements ont suscité beaucoup d'attention, en raison de la production de différents composés naturels et en raison de leurs mécanismes spécialisés pour l'adaptation aux environnements extrêmes (Singh *et al.*, 2012). Parmi cette microflore, nous retrouvons les actinomycètes halophiles dont l'existence a été dévoilée pour la première fois en 1975 par Gochner, suite à une contamination fortuite d'un milieu contenant 25% de NaCl. Le premier actinomycète halophile isolé par cet auteur a été nommé *Actinopolyspora halophila*. Par la suite, les études ont été orientées vers la recherche de nouveaux actinomycètes halophiles. Toutefois, contrairement aux bactéries non halophiles, relativement peu de travaux ont été signalés dans la littérature.

Les actinomycètes halophiles poussent de façon optimale dans des milieux contenant 5 à 25% de NaCl et même dans des milieux saturés en NaCl (Kushner et Kamekura, 1989; Kokare *et al.*, 2004). Ils sont largement distribués dans les différents habitats tels que les lacs hypersalés, les déserts, les sols salés, les marais salants, les étangs, les aliments salés et les mangroves (Ventosa, 1988; Senthilkumar, 2003).

Les actinomycètes halophiles occupent une place importante en raison de leur diversité et de leur capacité à produire de nouveaux métabolites. Ils représentent une source potentielle de molécules actives nouvelles (antibiotiques, osmorégulateurs, enzymes etc.), qui peuvent être utilisées dans les domaines médicaux, pharmaceutiques, agronomiques et alimentaires (Daane *et al.*, 2001; Bursy *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008; Deepika et Kannabiran, 2010; Setati, 2010; Parthasarathi *et al.*, 2011).

Les actinomycètes halophiles ont la capacité d'équilibrer la pression osmotique du milieu et de résister aux effets dénaturants des sels en sécrétant des osmolytes, telle que la glycine-bétaine (Oren, 1999), qui agissent contre le stress salin et stabilisent les enzymes et les acides nucléiques.

En outre, les actinomycètes halophiles constituent un modèle pour l'étude moléculaire des mécanismes d'osmorégulation qui leurs permettent de se développer en présence de NaCl. Cet aspect montre les applications possibles dans l'agriculture. Les plantes transgéniques tolérantes

au sel peuvent être développées et seraient capable de pousser dans des conditions de salinité élevée (Singh *et al.*, 2010).

Ces dernières années, plusieurs espèces halophiles ont été identifiées et décrites dans *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) et rattachées à différents genres, entre autres *Nocardiopsis* (19 espèces halophiles sur 42), *Saccharomonospora* (4 espèces halophiles sur 9), *Actinopolyspora* (6 espèces, toutes halophiles), *Saccharopolyspora* (4 espèces halophiles sur 20), *Prauserella* (7 espèces halophiles sur 9), etc. (Euzèby, 2011).

Les actinomycètes halophiles et halotolérants constituent donc un groupe de microorganismes d'environnement extrême, dont l'intérêt ne cesse d'augmenter dans le monde, en tant que matériel de recherche de la physiologie microbienne dans les milieux hostiles, ainsi que dans la production de nouveaux métabolites.

La recherche de nouvelles molécules ayant des propriétés thérapeutiques intéressantes continue d'être un domaine de recherche actif. Dans ce contexte, les études sur les actinomycètes extrémophiles seraient un précieux supplément, surtout en raison de la multirésistance des bactéries aux antibiotiques, la recrudescence des maladies bactériennes et les insuffisances encore perceptibles dans les traitements des maladies fongiques. Ceci a conduit les chercheurs à poursuivre, ces dernières années, leurs efforts dans la recherche de nouvelles molécules bioactives, dont des molécules antifongiques non polyéniques. De plus, les actinomycètes choisis tendent actuellement à être assez souvent des genres autres que *Streptomyces*, lequel a été très étudié par le passé.

Pour favoriser la sélection des actinomycètes halophiles, et en particulier des genres très faiblement représentés dans les sols, plusieurs méthodes ont été utilisées, dont les plus classiques sont les procédés de formulation de milieux de culture spécifiques, tout en ajoutant une quantité importante de NaCl. Toutes ces stratégies ont permis la découverte de nombreux genres et espèces nouveaux et également plusieurs substances originales dont des antibiotiques.

Les sols sahariens d'Algérie représentent des écosystèmes particuliers. Dans notre laboratoire (Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse, restructuré en Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger), l'exploration de ces sols a montré leur richesse et leur biodiversité en actinomycètes, des plus fréquents comme *Streptomyces* (Sabaou *et al.*, 1992), aux plus rares tels que *Actinomadura*, *Catellatosopra*, *Couchioplanes*, *Herbidospora*, *Nocardiopsis*,

Nonomuraea, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc. (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998). Plusieurs de ces souches sont des espèces nouvelles et produisent de nouvelles molécules antimicrobiennes (Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004a,b et 2005; Badji *et al.*, 2005; 2006a,b et 2007, Boudjella *et al.*, 2006, 2007 et 2010; Merrouche *et al.*, 2010 et 2011; Boubetra *et al.*, 2012).

Notre travail s'intègre dans le cadre d'un projet de recherche qui a pour objectif la mise en valeur et l'exploitation du potentiel en actinomycètes halophiles des écosystèmes sahariens d'Algérie par la recherche d'espèces ou de souches originales ou connues pour être rares ou peu fréquentes dans le monde et aussi par la recherche de molécules originales et/ou intéressantes par leur spectre d'action (activité antibactérienne et/ou antifongique), susceptibles d'être utilisées dans la lutte contre les maladies des plantes (fusarioses et autres), dans l'agroalimentaire et en thérapeutique.

Les objectifs de notre travail consistent en l'étude taxonomique de quarante trois isolats d'actinomycètes halophiles provenant de différents échantillons de sols salés sahariens, du point de vue phénotypique et phylogénétique, l'étude de l'antagonisme de ces isolats vis-à-vis de germes pathogènes pour l'homme et pour les plantes (bactéries à Gram⁺, bactéries à Gram⁻, levures et champignons), et la production, la purification et la caractérisation chimique des antibiotiques sécrétés par l'une des meilleures souches.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une étude bibliographique détaillée sur les actinomycètes en général et les actinomycètes halophiles en particulier. Nous avons présenté leur taxonomie polyphasique (classification supra-générique, critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires), la position taxonomique des familles contenant les genres halophiles, un aperçu sur leur écologie et leur importance biotechnologique dans les différents domaines (industriel, agroalimentaire, vétérinaire et médical) avec un intérêt particulier consacré à leur grande aptitude à produire des antibiotiques. En ce qui concerne cette dernière propriété, nous avons traité succinctement la production des antibiotiques, leur purification et leur caractérisation.

La seconde partie a trait aux différents matériels et méthodes utilisés, et la troisième partie, aux résultats obtenus et à leurs discussions. Cette dernière partie comprend quatre chapitres: le premier, le second et le troisième sont en rapport avec l'étude taxonomique et la mise en évidence des activités antibiotiques des actinomycètes halophiles et le quatrième en rapport avec l'étude de la meilleure souche productrice, du point de vue taxonomique et des composés

bioactifs sécrétés (cinétique de production, purification et études spectroscopiques des molécules actives).

Enfin, une discussion générale, ainsi que les conclusions et perspectives clôturent ce manuscrit.

Partie I

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE
SUR LES ACTINOMYCETES HALOPHILE**

III. TAXONOMIE DES ACTINOMYCETES

1. Classification supra-générique

Les actinomycètes sont classés dans le Règne des *Procaryotes*, le Domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria*, le Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria*, la Sous-Classe des *Actinobacteridae* et l'Ordre des *Actinomycetales* (Euzéby, 2011). Cet Ordre est défini dans le Manuel de Systématique de Bergey de 1994 et 2010 comme regroupant des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en guanine et cytosine (G+C) supérieur à 55%. Il comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant du cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium bien différencié et persistant (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, etc.).

Les actinobactéries sont classées dans 55 Familles (figure1) (Goodfellow et Fiedler, 2010). L'Ordre des *Actinomycetales* regroupe à lui seul presque 45 familles et près de 290 genres (Euzéby, 2011). Dans le tableau 1 sont regroupées les différentes familles de l'Ordre des *Actinomycetales* avec plusieurs genres. La figure 2 représente un dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre les différentes familles de la classe des actinobactéries, établi sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S (Kämpfer, 2010).

La systématique des actinomycètes est basée sur la taxonomie mixte et consensuelle (taxonomie polyphasique) introduite par Colwell en 1970. Cette classification tient compte d'un maximum de données: phénotypiques, chimiotaxonomiques et génétiques.

2. Critères morphologiques

Les critères morphologiques sont énoncés dans les "Bergey's Manual" de 1989, 1994 et 2010.

2.1. Caractéristiques macromorphologiques

Les caractères culturels contribuent parfois à différencier les groupes d'actinomycètes entre eux. Ces caractères consistent en:

- La production ou non d'un mycélium aérien (MA).
- La présence d'un mycélium du substrat (MS).
- La détermination de la couleur du MA et du MS ainsi que des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

Classe des *Actinobacteria*

Sous Classe	Ordre	Famille
<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Acidimicrobiaceae</i> <i>Iamiaceae</i>
<i>Actinobacteridae</i>	<i>Actinomycetales</i> <i>Bifidobacteriales</i>	Voir ci-dessous <i>Bifidobacteriaceae</i>
<i>Coriobacteridae</i> <i>Rubrobacteridae</i>	<i>Coriobacteriales</i> <i>Rubrobacterales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i> <i>Rubrobacteriaceae</i>
	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Solirubacteriaceae</i> <i>Conexibacteriaceae</i> <i>Patulibacteriaceae</i>
	<i>Thermoleophilales</i>	<i>Thermoleophilaceae</i>
<i>Nitriliruptoridae</i>	<i>Nitriliruptorales</i>	<i>Nitriliruptoraceae</i>
	<i>Euzebyales</i>	<i>Euzebyaceae</i>

Ordre des *Actinomycetales*

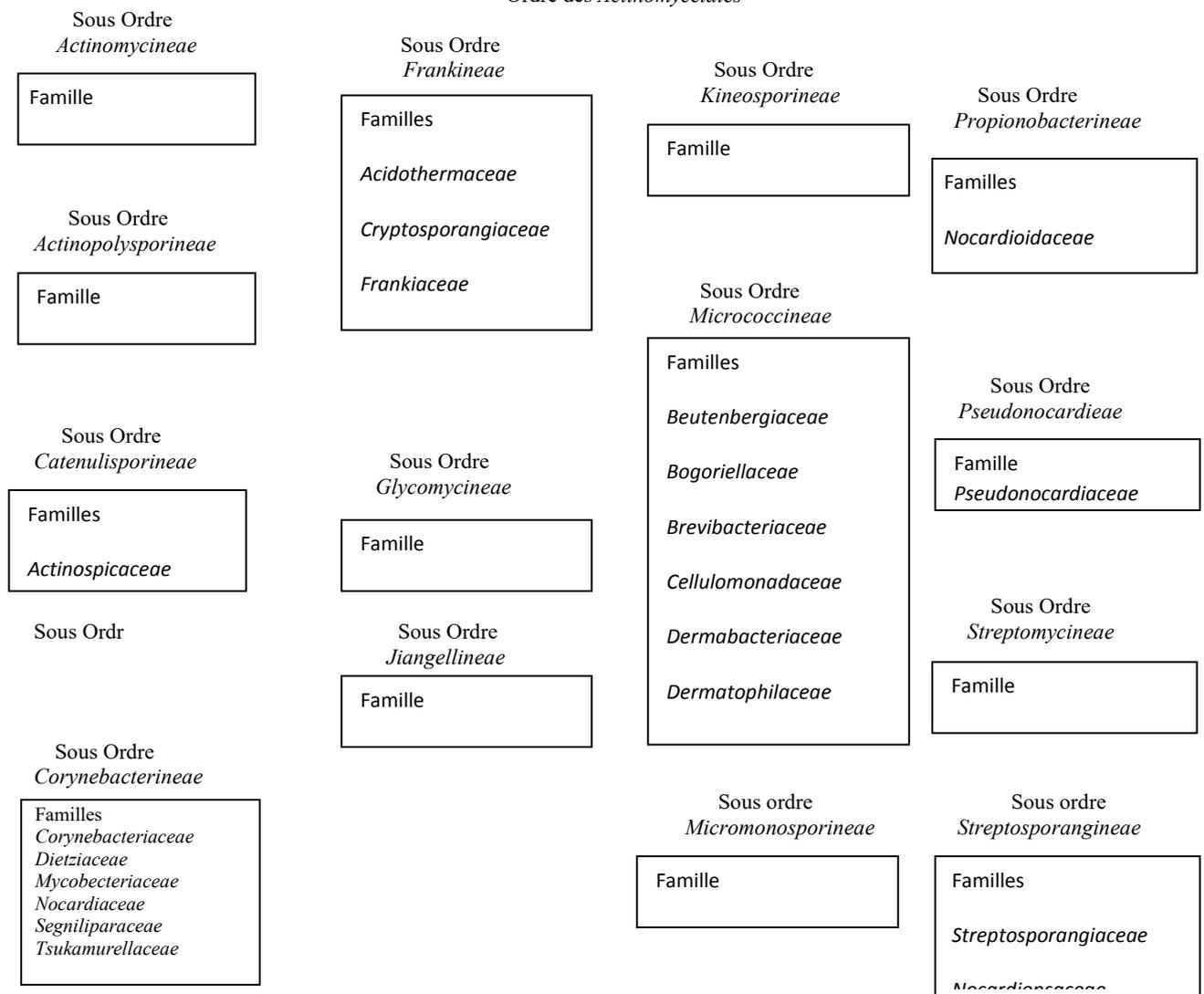


Figure 1. Classification supra-générique des actinobactéries (Goodfellow et Fiedler, 2010)

Tableau 1. Familles et genres de l’Ordre des *Actinomycetales* (Stackebrandt et Schumann, 2006), actualisée par des données bibliographiques récentes (Goodfellow et Fiedler, 2010; Euzéby, 2011)

Famille	Genre	Famille	Genre
<i>Yaniellaceae</i>	<i>Yaniella</i>	<i>Actinosynnemaceae</i>	<i>Actinosynnema</i>
<i>Jiangellaceae</i>	<i>Jiangella</i>		<i>Lenzea</i>
	<i>Haloactinopolyspora</i>		<i>Kutzneria</i>
		<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptoalloteichus</i>
			<i>Saccharothrix</i>
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>		<i>Streptomyces</i>
	<i>Actinobaculum, varibaculum</i>	<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Kitasatospora</i>
	<i>Arcanobacterium</i>		“ <i>Trichotomospora</i> ”
	<i>Mobiluncus, valcivibrio</i>		<i>Streptosporangium</i>
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>		<i>Microbispora</i>
	<i>Arthrobacter</i>		<i>Planomonospora</i>
	<i>Renibacterium</i>		<i>Planotetraspora</i>
	<i>Kocuria</i>		<i>Herbidospira</i>
	<i>Stomatococcus</i>		<i>Planobispora</i>
	<i>Nesterenkonia</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	“ <i>Sebekia</i> ”
	<i>Rothia</i>		“ <i>Cathayosporangium</i> ”
<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Cellulomonas</i>		<i>Nocardiopsis</i>
	<i>Oerskovia</i>		<i>Thermobifida</i>
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Promicromonospora</i>		<i>Frauserella</i>
<i>Dermatophilaceae</i>	<i>Dermatophilus</i>		<i>Streptomonospora</i>
<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Dermacoccus, Yimella</i>	<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Marinoactinospora</i>
	<i>Kytococcus, Luteipulveratus</i>		<i>Thermomonospora</i>
	<i>Demetria</i>		<i>Spirillospora</i>
<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>		<i>Actinomadura</i>
			“ <i>Parvopolysora</i> ”
<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Dermabacter, Devriesea</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	“ <i>Streptomycoïdes</i> ”
	<i>Helcobacillus</i>		<i>Micromonospora</i>
	<i>Brachybacterium,</i>		<i>Actinoplanes</i>
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Intrasporangium</i>		<i>Couchioplanes</i>
	<i>Janibacter</i>		<i>Catellatospora</i>
	<i>Terrabacter</i>		<i>Dactylosporangium</i>
	<i>Terracoccus</i>		<i>Catenuloplanes</i>
<i>Bogoriellaceae</i>	<i>Bogoriella</i>		<i>Pilimelia</i>
<i>Sanguibacteraceae</i>	<i>Sanguibacter</i>		<i>Spirilliplanes</i>
<i>Rarobacteraceae</i>	<i>Rarobacter</i>	<i>Catenulisporaceae</i>	<i>Verrucosispora</i>
<i>Jonesiaceae</i>	<i>Jonesia</i>	<i>Actinospicaceae</i>	<i>Catenulispora</i>
<i>Butenbergiaceae</i>	<i>Butenbergia</i>	<i>Frankiaceae</i>	<i>Actinospica</i>
	<i>Salana, Serinibacter</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Frankia</i>
	<i>Miniimonas</i>		<i>Geodermatophilus</i>
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>		<i>Blastococcus</i>
	<i>Agrococcus</i>	<i>Nakamurillaceae</i>	<i>Modestobacterium</i>
	<i>Agromyces</i>		<i>Nakamurella</i>
	<i>Clavibacter</i>		<i>Humicoccus</i>
	<i>Leucobacter</i>	<i>Sporichthyaceae</i>	<i>Saxeibacter</i>
	<i>Rathayibacter</i>	<i>Microsphaeraceae</i>	<i>Sporichthya</i>
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Acidothermaceae</i>	<i>Microsphaera</i>
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Cryptosporangiaceae</i>	<i>Acidothermus</i>
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Propionibacteraceae</i>	<i>Cryptosporangium</i>
	<i>Rhodococcus</i>		<i>Propionibacterium</i>
	<i>Segniliparus</i>		<i>Friedmaniella</i>
<i>Segniliparaceae</i>	<i>Segniliparus</i>		<i>Luteococcus</i>
<i>Tsukamurellaceae</i>	<i>Tsukamurella</i>		<i>Microlunatus</i>
<i>Dietziaceae</i>	<i>Dietzia</i>		<i>Propioniferax</i>
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Nocardioideaceae</i>	<i>Tessaracoccus</i>
	<i>Actinobispora</i>		<i>Nocardioïdes</i>
	<i>Actinoalloteichus</i>		<i>Aeromicrobium</i>
	<i>Amycolatopsis</i>		“ <i>Hongia</i> ”
	<i>Saccharomonospora</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Glycomyces</i>
	<i>Kibdelosporangium</i>		<i>Haloglycomyces</i>
	<i>Saccharopolyspora</i>		<i>Stackebrandtia</i>
	<i>Thermocrispum</i>	<i>Kineosporaceae</i>	<i>Kineococcus, Angustibacter,</i>
<i>Actinopolysporaceae</i>	<i>Actinopolyspora</i>		<i>Kineospora, Quadrisphaera</i>

- En souligné les familles et les genres contenant des espèces halophiles ou halotolérantes.

- Les genres mis entre guillemets n’ont pas encore été validés.

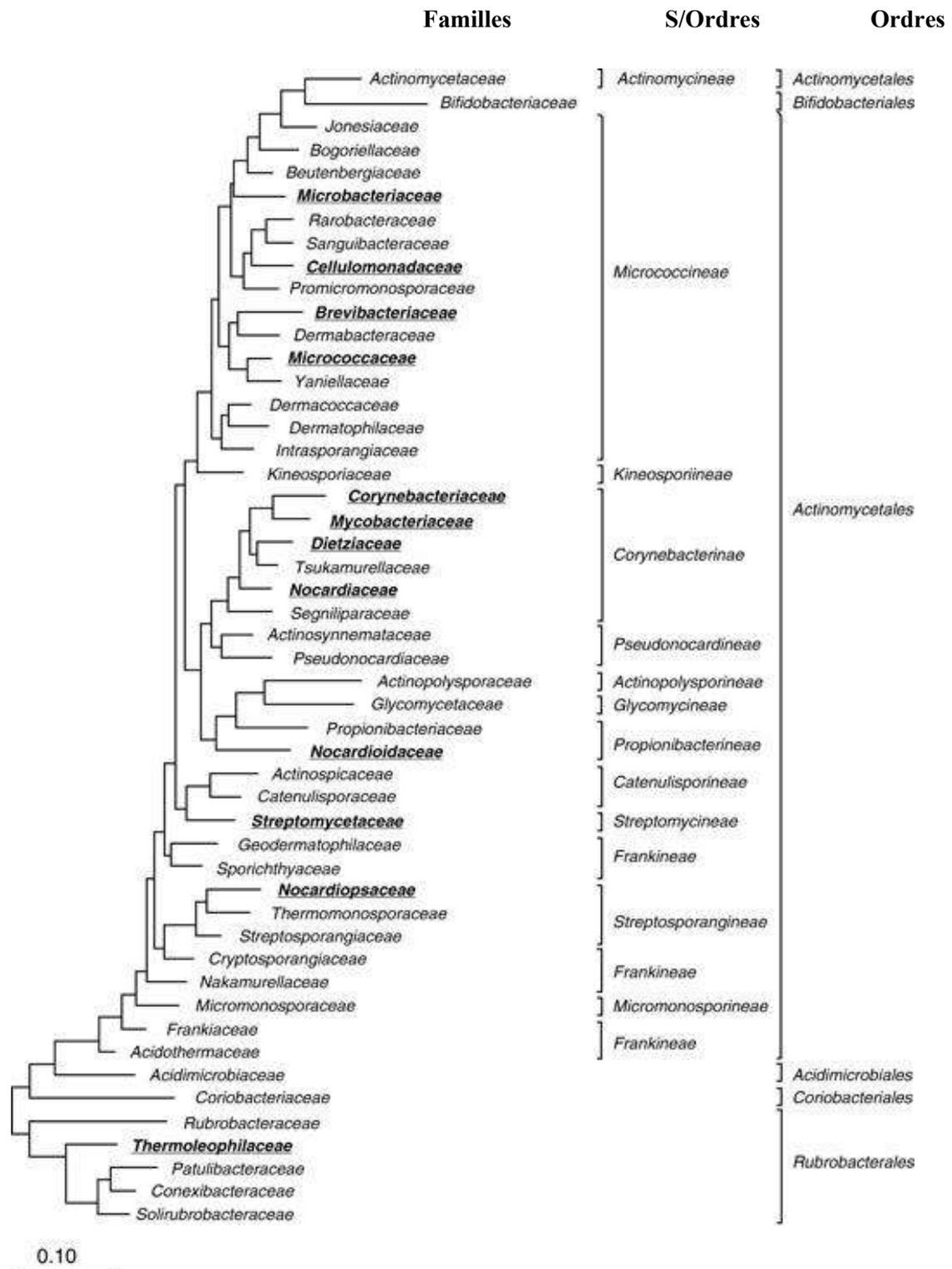


Figure 2. Dendrogramme montrant les relations phylogéniques entre les différentes familles de la classe des actinobactéries, établi sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S (Kämpfer, 2010). La barre indique 0,10 substitution par position de nucléotide.

2.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les critères micromorphologiques sont:

- La fragmentation ou non du MS.
- La présence de sporanges sur le MA (*Streptosporangium*, *Spirillospora*, etc.) ou sur le MS (*Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, etc.), la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores.
- La formation de spores sur le MA et/ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement: isolées (*Micromonospora*, *Saccharomonospora*), par deux (*Microbispora*), par quatre (*Microtetraspora*) ou en chaînes (*Actinomadura*, *Streptomyces*, etc.).
- Le mode de sporulation: spores portées par des sporophores (*Streptomyces*, *Actinomadura*, etc.) ou mycélium aérien se fragmentant de manière anarchique en spores (*Nocardiosis*, *Amycolatopsis*, *Saccharothrix*, etc.).
- La présence de spores mobiles (*Spirillospora*, *Actinoplanes*, etc.) ou non mobiles (*Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, etc.).
- L'ornementation de la surface des spores (lisses, rugueuses, épineuses ou chevelues).
- La formation de structures particulières: synnemata (*Actinosynnema*), faux sporanges (*Kibdelosporangium*), etc.

La micromorphologie des principaux genres et quelques exemples sont donnés respectivement dans les figures 3 et 4.

3. Critères chimiques (chimiotaxonomie)

Ces critères sont basés sur la détermination de la composition cellulaire en acides aminés pariétaux, en sucres (cellules entières) et en lipides membranaires et pariétaux (Jones et Krieg, 1989).

3.1. Acide diaminopimélique et autres acides aminés

Les actinomycètes, comme tous les procaryotes, possèdent une paroi à base de muréine à laquelle sont associés d'autres acides aminés tels que l'alanine (L et D), l'acide glutamique, la glycine (pour certains) et l'acide diaminopimélique (DAP). Ce dernier peut être sous forme isomérique LL ou DL (ou méso) et ce, suivant les genres: LL pour *Streptomyces*, *Nocardioïdes*, *Kineosporia*, etc., et DL pour *Saccharothrix*, *Nocardiosis*, *Nocardia*, *Micromonospora*, etc.

Parfois, le DAP est remplacé par de la lysine, de l'ornithine ou de l'acide diaminobutyrique chez les actinomycètes ne formant pas de véritable mycélium (Holt *et al.*, 1994).

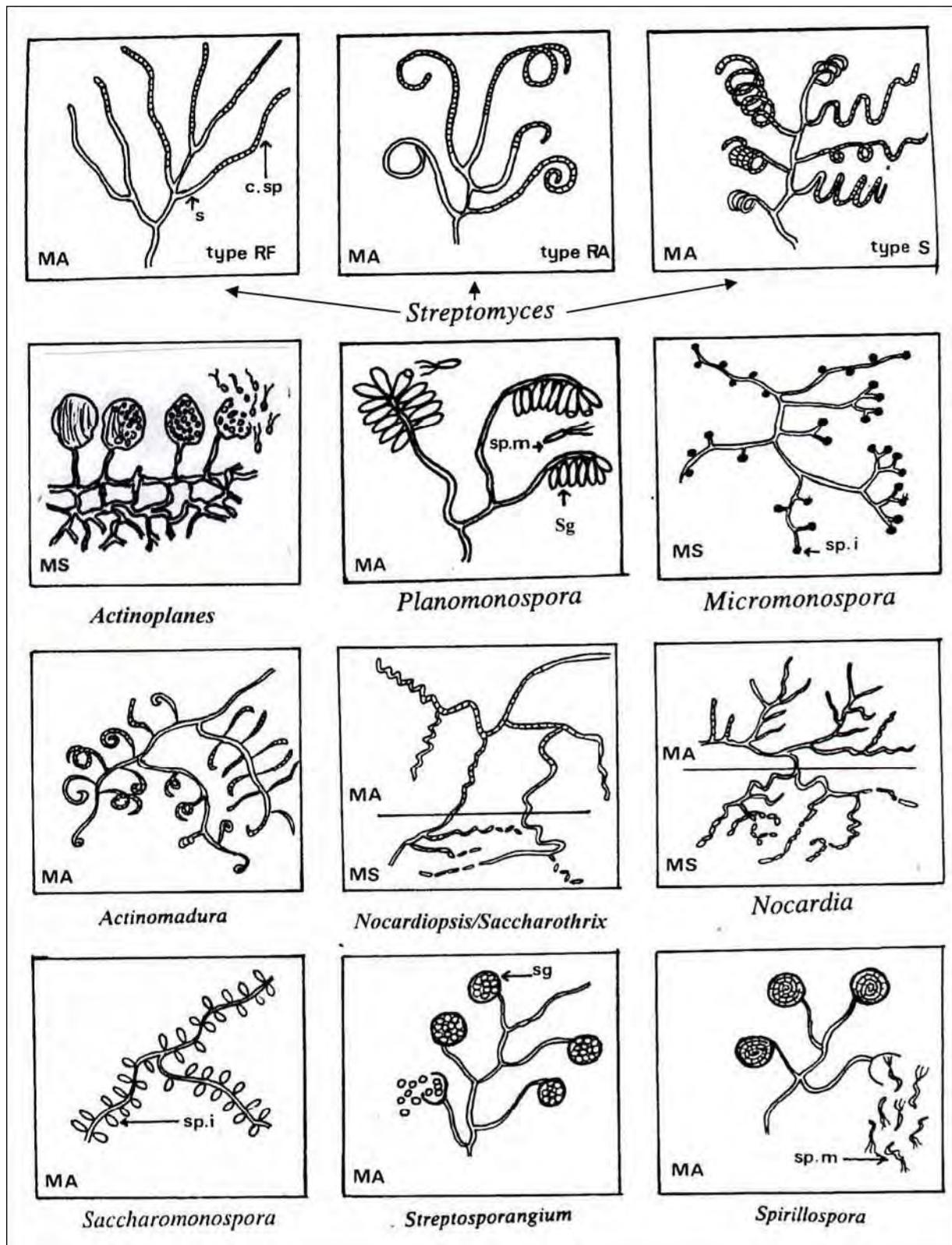


Figure 3. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes (Sabaou, 1988).

MA= mycélium aérien ; MS = mycélium du substrat. RF = *Rectus-Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses). RA = *Retinaculum-Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles). S = *Spira* (chaînes spiralées). s = sporophore. c.sp.= chaînes de spores. sp.i.= spores isolées. sp.m. spores mobiles. sg = sporanges.

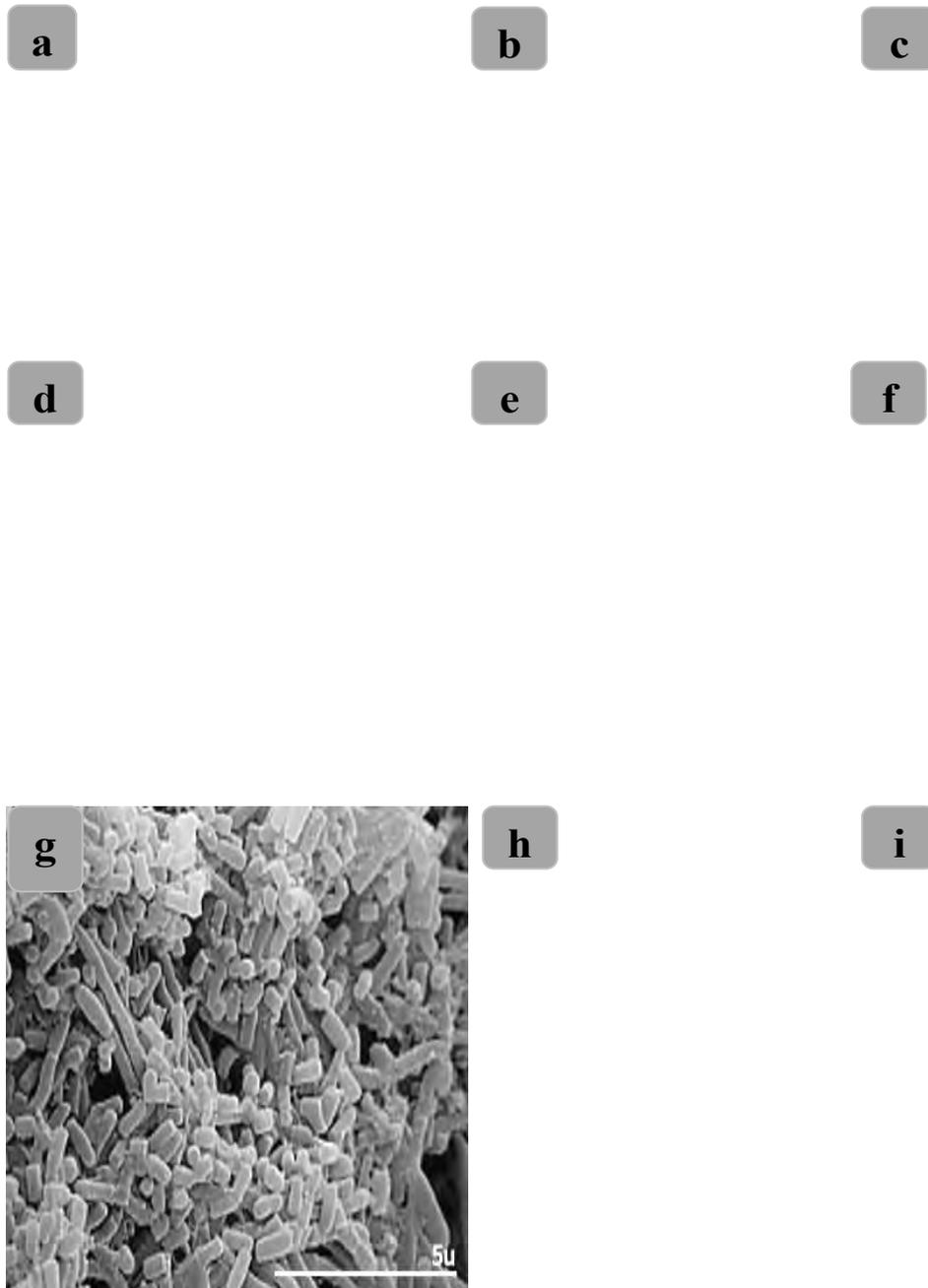


Figure 4. Micromorphologie de quelques espèces d'actinomycètes appartenant à différents genres.

Les observations ont été effectuées au microscope électronique à balayage.

- a. *Saccharopolyspora interjecta* SANK 60983 (Miyadoh *et al.*, 2002) Bar, 5 μ m.
- b. *Nocardiopsis lucentensis* ATCC 51300 (Yassin *et al.*, 1993). Bar, 1 μ m.
- c. *Pseudonocardia spinosa* KCTC 9991T (Miyadoh *et al.*, 2002) Bar, 2 μ m.
- d. *Saccharomonospora viridis* IFO 12207 (Miyadoh *et al.*, 2002). Bar, 1 μ m.
- e. *Microtetraspora roseola* JCM 3323 (Miyadoh *et al.*, 2002). Bar, 1 μ m.
- f. *Micromonospora* sp. SF2259 (Miyadoh *et al.*, 2002). Bar, 1 μ m.
- g. *Glycomyces rutgersensis* NRRL B-16106 (Miyadoh *et al.*, 2002). Bar, 5 μ m.
- h. *Streptomyces* sp. SF2587 (Miyadoh *et al.*, 2002). Bar, 1 μ m.
- i. *Actinoalloteichus cyanogriseus* (IFO14455T) (Tamura *et al.*, 2000) Bar, 5 μ m.

3.2. Glucides cellulaires

Dans les cellules entières des actinomycètes, divers sucres ont été retrouvés, dont certains ont une importance taxonomique. Ces derniers sont les couples "arabinose-galactose" (*Nocardia*, *Saccharomonospora*, etc.), "arabinose-xylose" (*Micromonospora*, *Actinoplanes*, etc.), "rhamnose-galactose" (*Saccharothrix*, *Lentzea*, etc.) et madurose, identifié par Lechevalier et Lechevalier (1970b) comme étant du 3-0-méthyl-galactose (*Actinomadura*, *Streptosporangium*, etc.).

Sur la base de la composition des cellules en acides aminés (Becker *et al.*, 1965; Yamagushi, 1965) et en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970b), plusieurs chimiotypes ont ainsi été définis.

- Type IC: LL DAP + glycine, pas de sucres taxonomiquement importants (pas d'arabinose, xylose, rhamnose et madurose).
- Type IID: DL DAP + glycine + arabinose + xylose.
- Type IIIB: DL DAP + madurose.
- Type IIIC: DL DAP, pas de sucres caractéristiques.
- Type IIIE: DL DAP + rhamnose + galactose.
- Type IVA: DL DAP + arabinose + galactose.
- Type V: ornithine + lysine.
- Type VI: lysine.
- Type VII: acide diaminobutyrique + glycine (lysine variablement présente).
- Type VIII: ornithine.

Le chimiotype pariétal a permis de faire la distinction entre les genres présentant des caractères morphologiques assez proches (Williams et Wellington, 1981), comme par exemple *Nocardiopsis* et *Streptomyces*.

3.3. Lipides membranaires et pariétaux

Chez certains genres d'actinomycètes, la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour leur identification. Il est indispensable d'analyser les lipides cellulaires, principalement les phospholipides (lipides polaires), les ménaquinones (à noyau quinone méthylé), les acides gras et les acides mycoliques (ces derniers étant des lipides pariétaux complexes et insaturés). 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 importants en taxonomie peuvent être divisés en trois groupes: les lipides polaires, les acides gras et les ménaquinones.

3.3.1. Les phospholipides

La diversité des phospholipides a permis à Lechevalier *et al.* (1977) de distinguer cinq types notés de PI à PV et caractérisés par la présence généralement d'un ou de deux phospholipides caractéristiques.

- Type PI: il se distingue par l'absence de phospholipides azotés tels que la phosphatidyl-éthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC). Ex.: *Spirillospora*, *Actinomadura*.
- Type PII: il est caractérisé par la présence de la PE. Ex.: *Streptomyces*, *Saccharothrix*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Spirillospora*.
- Type PIII: présence de la PC. Ex.: *Nocardiosis*, *Saccharopolyspora*.
- Type PIV: présence de PE et de phospholipides contenant de la glucosamine (PG). Ex.: *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*.
- Type PV: présence de PG et de phosphatidylglycérol. Ex.: *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Promicromonospora*.
-

3.3.2. Les acides gras

La composition en acides gras des membranes plasmiques a également contribué dans la séparation entre certains genres (Minnikin *et al.*, 1975). Elle est utilisée en combinaison avec les autres critères chimiques lorsque le cas s'impose. Le type et le pourcentage des acides gras sont caractéristiques de plusieurs genres (Grund et Kroppenstedt, 1990; Kroppenstedt *et al.*, 1990; Rainey *et al.*, 1996). Plusieurs types sont distingués et résumés dans le tableau 2 (Kroppenstedt, 2006).

La composition en acides gras des microorganismes dépend de plusieurs facteurs comme la température, le pH, la phase de croissance, la composition du milieu de culture et la concentration en sel (Smith *et al.*, 1980). La technique FAME (Fatty Acid Methyl Ester) est fondée sur l'analyse des profils d'acides gras obtenus par chromatographie en phase gazeuse. Chaque profil est spécifique d'une souche et peut être comparé avec d'autres contenus dans des bases de données (Guezennec, 1995; Keith-Roach *et al.*, 2002).

3.3.3. Les acides mycoliques

Ce sont des composés pariétaux présents uniquement chez certains actinomycètes ayant le chimiotype IVA. Ils sont donc utiles pour différencier certains genres de ce type entre eux, par leur présence ou leur absence (Mordarska *et al.*, 1972). Les acides mycoliques sont présents chez *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, etc., et absents chez *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, etc. (Holt *et al.*, 1994).

Tableau 2. Types d'acides gras retrouvés chez les différents genres d'*Actinomycetales* (Kroppenstedt et Eventushenko, 2006).

Genres	Type	Iso-15:0	Anté-iso-15:0	Iso-16:0	16:0	10- Méthyle 16:0	Iso-17:0	Anté-iso-17:0	17:0	17:1	10-Méthyle 17:0	Iso-18:0	18:0	18:1	10- Méthyle 18:0	2-OH	Cyclo 19:0
<i>Corynebacterium</i>	1a	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	-	-	-
<i>Nocardia</i>	1b	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-
<i>Actinomyces</i>	1c	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	++
<i>Saccharomonospora</i>	2a	+	-	+++	++	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	++	-
<i>Thermoactinomyces</i>	2b	+++	++	++	+	-	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i>	2c	++	+++	+++	+	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	V	-
<i>Actinoplanes</i>	2d	+++	++	++++	++	-	++	-	+	+	-	+	+	++	-	-	-
<i>Actinomadura</i>	3a	-	-	++	+++	+	-	-	+	+	+	+	+	++	-	-	-
<i>Micromonospora</i>	3b	++++	+	++	-	-	++	++	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Microtetraspora</i>	3c	++	+	+++	+	+	+	+	++	++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Nocardiopsis</i>	3d	+	+	+++	+	-	+	+++	+	+	++	+	+	++	-	-	-
<i>Pseudonocardia</i>	3 ^e	++	-	++++	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Amycolatopsis</i>	3f	++	+	++++	+	-	+	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharothrix</i>	3g	++	+	++++	+	-	+	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Symboles: +, représente 1-5% du total des acides gras; ++, représente 5-10% du total des acides gras; +++, 15-20% du total des acides gras; +++++, 25% du total des acides gras; -, absent et (v), variable, généralement moins de 2% pour un composant.

Type 1, dominance d'acides gras non ramifiés saturés et insaturés; type 2, dominance d'acides gras ramifiés iso/antéiso; type 3, dominance d'acides gras ramifiés iso/antéiso et d'acides gras ramifiés et méthylés.

3.3. 4. Les ménaquinones

Les ménaquinones sont des composés lipidiques membranaires constitués d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne aliphatique contenant des unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (Collins *et al.*, 1980).

Ex.: ménaquinone MK10 (H2) présent chez *Nocardiosis*: ménaquinone avec dix unités isoprènes dont deux sont hydrogénées.

Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus avec les phospholipides.

Les acides mycoliques, les ménaquinones et les acides gras ont permis de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides et de distinguer ainsi plusieurs genres entre eux, en particulier *Pseudonocardia* de *Amycolatopsis* (Lechevalier *et al.*, 1986) et *Actinomadura* de *Microtetraspora* et de *Nonomuraea* (Kroppenstedt *et al.*, 1990).

4. Clé d'identification des genres

Les critères morphologiques et chimiques permettent de déterminer les différents genres appartenant à l'Ordre des *Actinomycetales*, comme le montre le tableau 3 qui représente une clé d'identification dichotomique simplifiée.

4. Critères d'identification des espèces

5.1. Caractéristiques physiologiques

Les tests physiologiques utilisés consistent en des tests de dégradation de différents composés (glucides, lipides, protéines, 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.

L'étude physiologique permet de distinguer les espèces d'actinomycètes appartenant à un même genre.

5.2. Caractéristiques moléculaires

La classification moderne des procaryotes est basée sur l'analyse des acides nucléiques. Elle permet une approche phylogénétique. Elle est possible depuis le développement des méthodes génétiq

Tableau 3. Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes basée sur les critères chimiques et morphologiques.

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

Note: DAP, acide diaminopimélique; NC, non caractéristique; ND, non déterminé; arab., arabinose; gal., galactose; Rham., rhamnose, xyl., xylose; MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat. Phospholipides: PI, pas de phospholipides azotés; PII, présence de phosphatidyléthanolamine (PE); PIII, présence de phosphatidylcholine; PIV, présence de PE et de phospholipides avec glucosamine (PG); PV, PG avec phosphatidylglycérol. Ménaquinones prédominants (= MK): exemple MK9 (H4) = ménaquinone à 9 unités isoprènes possédant 4 sites d'hydrogénation (2 unités isoprènes saturées par atomes d'hydrogène).

Les principales analyses moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomique 16S, l'hybridation ADN-ADN et la détermination du pourcentage de G+C qui n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition de création de nouveaux genres. Ces critères ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes (Stackebrandt et Woese, 1981; Stackebrandt *et al.*, 1997; Kämpfer, 2010).

5.2.1. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Le séquençage de l'ADNr 16S est une technique fiable pour l'identification des actinomycètes (Weisburg *et al.*, 1991; Cook et Meyers, 2003). Le gène de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S (appelé ADNr 16S) est l'outil principal utilisé pour l'identification moléculaire des actinomycètes. Il s'agit d'un gène chromosomique d'une taille d'environ 1500 paires de bases, présent chez toutes les bactéries, dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15 premières et 15 dernières bases) sont conservées dans toutes les espèces bactériennes. Ce gène est amplifié par la technique Polymerase Chain Reaction (PCR) grâce à une ADN polymérase (polymérase Taq) isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*.

Les séquences obtenues des différents taxons sont soumises à des études de comparaisons (ou encore de phylogénie) entre elles ou bien avec des espèces de références répertoriées dans des banques de données génomiques. Pour effectuer ce genre d'études, plusieurs méthodes de calculs ont été mises au point et sont disponibles sous forme de programmes informatisés gratuits dans le Web (Philip, Clustal W, etc.).

Ces programmes mettent à disposition plusieurs outils de traitement des séquences nucléotidiques, comme les outils d'inversion des séquences, d'alignement (simple ou multiple), de conversion entre les différents formats des fichiers des séquences, des outils de recherche et de comparaison avec les banques de données génomiques (ex.: "Blast"), etc. Sont aussi disponibles tous les programmes indispensables pour les études phylogénétiques comme:

- Les méthodes de calcul des matrices de distances d'évolution (ex.: Jukes et Cantor, 1969; Kimura, 1980, etc.).
- Les méthodes indispensables aux algorithmes de construction des topologies des arbres phylogénétiques; ex.: méthodes de Parsimony (Fitch, 1972), du Maximum-Likelihood (Felsenstein, 1981), du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987), etc.
- Les méthodes de validation statistique des liens phylogénétiques établis; ex.: le Bootstrap (Felsenstein, 1985).

La méthode la plus couramment utilisée en microbiologie pour la construction des arbres phylogénétiques est la méthode du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987): c'est une méthode de

distance basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences les plus «voisines » qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. C'est une méthode rapide, qui génère un arbre selon l'évolution minimale et donne de bons résultats.

L'analyse de l'ADNr 16S constitue un outil très rapide pour l'identification des espèces. Ces dernières années, elle a été utilisée pour les groupes à un niveau supra-générique (Famille, Ordre et même Classe) (Rainey *et al.*, 1996; Stackebrandt *et al.*, 1997; Labeda et Krosppenstedt, 2000; Euzéby, 2011). Les souches sont définies comme étant des espèces différentes si le taux de similarité des séquences est inférieure ou égale à 97%, et similaires si le taux de similarité des séquences est supérieur à 97% (Stackebrandt et Gobel, 1994). Par ailleurs, Stackebrandt et Ebers (2006) ont suggéré une élévation de ce seuil de similarité de 97 à 98,7 puis à 99% pour la détermination des espèces distinctes, à condition que ces données soient confirmées par de nettes différences phénotypiques. Au-delà de ce seuil, une hybridation ADN-ADN sera nécessaire.

5.2.2. Hybridation ADN-ADN

L'hybridation moléculaire ADN-ADN est utilisée de façon certaine pour l'identification des espèces en comparaison avec celles déjà décrites. Sa réalisation n'a été possible qu'après la découverte des phénomènes de renaturation de l'ADN (Marmur et Doty, 1962). Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance (taux de réassociation de leurs brins d'ADN) inférieur à 70% (Wayne *et al.*, 1987).

5.2.3. Détermination du pourcentage de guanine-cytosine (G+C)

En 1949, Chargaff *et al.* ont montré que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier d'un individu à un autre mais était constant pour les individus d'une même espèce. Le contenu en base d'un ADN est exprimé par le pourcentage de guanine-cytosine (% GC). Chez les bactéries, cette valeur est très dispersée et varie de 25 à 75% (Rosselló-Mora et Amann, 2001). Actuellement, on admet que les bactéries dont le contenu G+C diffère de plus de 5% ne peuvent appartenir à une même espèce. Lorsque cette différence excède 10%, les deux bactéries appartiennent à des genres différents. Cependant, les valeurs peuvent être identiques sans que les bactéries soient proches (Rosselló-Mora et Amann, 2001). Selon Stackebrandt *et al.* (1997), la détermination du G+C (%) devrait être effectuée pour l'isolat-type de l'espèce-type d'un nouveau genre.

Le pourcentage GC a permis de reconsidérer la définition des actinomycètes (G+C supérieur à 55%) et de différencier la lignée des actinomycètes de celle des *Bacillaceae*, des *Lactobacillaceae*

et d'autres bactéries à Gram⁺ (G+C inférieur à 55%). De même, d'autres bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus*, sont considérées comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinomycètes (Goodfellow, 1985 et 1989).

5.3. Procédure d'identification

L'approche taxonomique est actuellement polyphasique. La première étape consiste à regrouper les souches en fonction de leurs caractères phénotypiques. L'homogénéité des phénons ainsi obtenus est confirmée par les méthodes génotypiques (séquençage de l'ADN ribosomique 16S et phylogénie, GC% et hybridation ADN-ADN). La dernière étape consiste à vérifier que les groupes génotypiques possèdent des caractères physiologiques communs et faciles à effectuer permettant d'identifier ces groupes.

IV. ACTINOMYCÈTES HALOPHILES ET HALOTOLERANTS

La plupart des bactéries modérément halophiles ou halotolérantes décrites et isolées à partir des sols sont hétérotrophes.

3. Halophilie et halotolérance

L'isolement des actinomycètes à partir d'environnements très salés et leur tolérance à des concentrations élevées de sel ont été décrits pour la première fois par Tresner *et al.* en 1968 et par Gottlieb en 1973. La première souche d'actinomycète halophile extrême a été isolée fortuitement par Gochnauer en 1975, à partir d'une contamination d'une culture d'halobactérieensemencée sur un milieu à 25% de NaCl.

On différencie les bactéries halophiles des bactéries halotolérantes. En effet, le terme «halophile » désigne les microorganismes nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En revanche, le terme « halotolérant » signifie que les microorganismes tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance. Les bactéries nécessitant moins de 1% de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles.

En 1978, Kushner a défini 5 catégories de bactéries halophiles selon la concentration en sels qui amène à une croissance optimale des microorganismes. Cette concentration peut varier de 1,16 à 2,9% (w/v) pour les bactéries faiblement halophiles, de 2,9 à 14,5% (w/v) pour les bactéries halophiles modérées, 8,7 à 23,2% pour les bactéries halophiles "limite" et de 14,5 à 30% (w/v) pour les bactéries halophiles extrêmes (tableau 4). Par ailleurs, les bactéries halotolérantes tolèrent des

concentrations modérées en sel mais celui-ci n'est pas obligatoire pour leur croissance. En 1986, Larsen a défini 3 catégories de bactéries halotolérantes: les faiblement halotolérantes, les halotolérantes modérées et les halotolérantes extrême (tableau 5).

2. Position taxonomique des actinomycètes halophiles et halotolérants

2.1. Position taxonomique des genres halophiles parmi les différentes familles

La diversité phylogénique des actinomycètes halophiles des environnements hypersalés a été étudiée. Cette étude a révélé que les actinomycètes halophiles sont représentés par les familles suivantes: *Nocardiopsaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Actinopolysporaceae* (Guan *et al.*, 2007 et Ventosa *et al.*, 2008), *Glycomycetaceae* (Guan *et al.*, 2009) et *Streptomycetaceae* (Deepika et Kannabiran 2009a). Les genres les plus abondants sont *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis* et *Streptomonospora* (Guan *et al.*, 2007). On peut citer aussi, *Haloactinospora*, *Haloglycomyces*, *Prauserella*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Thermobifida*, *Amycolatopsis* etc.

La majorité des actinomycètes halophiles a été isolée a partir de divers habitats hypersalés de Chine (tableaux 6a, b).

2.2. Espèces halophiles

2.2.1. Famille des *Nocardiopsaceae*

La famille des *Nocardiopsaceae* à été crée par Rainey *et al.* (1996). Une année plus tard, cette famille a été combinée avec les *Streptosporangiaceae* et *Thermonosporaceae* dans le Sous-Ordre des *Streptosporangineae* qui est un des dix Sous-Ordres de l'Ordre des *Actinomycetales* (Stackebrandt *et al.*, 1997). A l'origine, la famille des *Nocardiopsaceae* contenait uniquement le genre-type *Nocardiopsis* (Meyer 1976). Plus tard, Zhang inclue *Thermobifida*, un nouveau genre qui regroupe 2 espèces, *Thermobifida alba* et *Thermobifida fusca* (Zhang *et al.*, 1998). Puis, un troisième genre, *Streptomonospora*, a été additionné à cette famille (Cui *et al.*, 2001). Par la suite, un quatrième genre halophile a été découvert et appelé *Haloactinospora*, avec une seule espèce halophile (Tang *et al.*, 2008) et enfin un dernier genre, *Marinactinospora*, contenant une seule espèce (*M. thermotolerans*) (Tian *et al.*, 2009). Sur les cinq genres cités précédemment, quatre d'entre eux contiennent des espèces halophiles: *Nocardiopsis*, *Thermobifida*, *Streptomonospora* et *Haloactinospora*.

Tableau 4. Classification des microorganismes en fonction de leur comportement au NaCl (Kushner, 1978).

Groupe	Concentration de NaCl	Exemples*
Non halophile	<0,2 M (1,16%)	La plupart des eubactéries
Faiblement halophile	0,2 à 0,5 M (1,16-2,9%)	Les actinomycètes marins; <i>Nocardiopsis</i> ; <i>Saccharomonospora marina</i> .
Modérément halophile	0,5 à 2,5 M (2,9-14,5%)	<i>Nocardiopsis kunsanensis</i> ; <i>Streptomyces rochei</i> MTCC10109. <i>Actinopolyspora alba</i> ; <i>Actinopolyspora erythraea</i> .
Halophile extrême "Limite"	1,5 à 4,0 M (8,7-23,2%)	<i>Actinopolyspora halophila</i> ; <i>Saccharomonospora halophila</i> .
Halophile extrême	2,5 à 5,2 M (14,5-30%)	<i>Halobacterium salinarium</i> ; <i>Halococcus morrhuae</i> .
Halotolérant	0 à 2,5 M (0-14,5%)	<i>Nocardiopsis halotolerans</i> ; <i>N. nikkonnensis</i> ; etc. <i>Streptomyces albus</i>

* exemples de genres et d'espèces tirés à partir de données bibliographiques récentes.

Tableau 5. Classification des bactéries halotolérantes selon Larsen (1986).

Groupe	Concentration de NaCl
Halotolérants faibles	0 à 1,25 M (0-7,25%)
Halotolérants modérés	0 à 1,72 M (0-10%)
Halotolérants extrêmes	0 à 2,5 M au plus (0-14,5% au plus)

2.2.1.1. Espèces du genre *Nocardiopsis* (Meyer, 1976)

Ce genre est défini comme regroupant les espèces ayant les propriétés suivantes:

- un mycélium aérien se fragmentant de manière anarchique (sans sporophore distinct) en chaînes de spores en “zig-zag”.
- un mycélium du substrat plus ou moins fragmenté.
- une paroi cellulaire de type IIIC: méso DAP et absence de glycine et de sucres diagnostiques (Lechevalier et Lechevalier, 1970b).
- des phospholipides de type PIIB: phosphatidylcholine comme lipide caractéristique (Lechevalier *et al.*, 1977).
- des acide gras de type 3d: à chaînes ramifiées iso, antéiso et 10-méthylés (Kroppenstedt, 1985).
- des ménaquinones de type MK10 avec un degré variable de saturation dans la chaîne latérale (Kroppenstedt 1992).
- une absence d'acides mycoliques dans la paroi cellulaire.
- un taux de G+C compris entre 64 et 71% (Grund et Kroppenstedt 1990).

Les espèces diffèrent entre elles par des caractères physiologiques et moléculaires.

À l'heure actuelle, le genre *Nocardiopsis* comprend 42 espèces validées dont dix neuf sont modérément halophiles ou halotolérantes.

Les espèces halophiles et halotolérantes de ce genre, isolées à partir d'échantillons de divers sols, de marais salants et de sédiments salés sont: *Nocardiopsis lucentensis* (Yassin *et al.*, 1993), *N. halophila* (Al Tai et Ruan, 1994), *N. kunsanensis* (Chun *et al.*, 2000), *N. halotolerans* (Al Zarban *et al.*, 2002a), *N. xinjiangensis* (Li *et al.*, 2003a), *N. salina* (Li *et al.*, 2004), *N. aegyptia* (Sabry *et al.*, 2004), *N. baichengensis*, *N. chromatogenes*, *N. gilva*, *N. rhodophaea*, *N. rosea* (Li *et al.*, 2006), *N. quinghaiensis* (Chen *et al.*, 2008), *N. arabia* (Hozzein et Goodfellow, 2008), *N. potens* (Yassin *et al.*, 2009), *N. litoralis* (Chen *et al.* 2009), *N. nikkonensis* (Yamamura *et al.*, 2010), *N. sinuspersici* (Hamedi *et al.*, 2010) et *N.terrae* (Chen *et al.*, 2010a).

L'origine des souches et leurs exigences en NaCl sont mentionnées dans le tableau 6a. La phylogénie de ces espèces, sur la base de l'ADNr 16S, est illustrée par la figure 5.

Tableau 6a. Liste des espèces d'actinomycètes halophiles et halotolérantes de l'Ordre des *Actinomycetales* et de la famille des *Nocardiopsaceae*.

Espèces	Origine	Gamme (optimum) de NaCl (%)	Référence
<i>Haloactinospora alba</i>	Lac salé, Xinjiang (Chine).	15	Tang <i>et al.</i> (2008)
<i>Nocardiopsis nikkonensis</i>	Compost (Japon).	0-10	Yamamura <i>et al.</i> (2010)
<i>Nocardiopsis terrae</i>	Sols salés, Bassin de Qaidam (Chine).	1-15 (3-5)	Chen <i>et al.</i> (2010a)
<i>Nocardiopsis sinuspersici</i>	Sol sableux rhizosphérique (Golfe persique).	0-15 (2,5)	Hamedi <i>et al.</i> (2010)
<i>Nocardiopsis potens</i>	Déchets ménagers.	0-16 (12)	Yassin <i>et al.</i> (2009)
<i>Nocardiopsis litoralis</i>	Mer "Anémone"(Chine).	1-15 (5-7)	Chen <i>et al.</i> (2009)
<i>Nocardiopsis arabia</i>	Sable (Egypte).	0-18	Hozzein and Goodfellow (2008).
<i>Nocardiopsis quinghaiensis</i>	Sols salés, bassin de Qaidam (Chine).	0-10 (3)	Chen <i>et al.</i> (2008)
<i>Nocardiopsis baichengensis</i>	Sédiments salés du Xinjiang (Chine).	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> (2006)
<i>Nocardiopsis chromatogenes</i>	" " "	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> (2006)
<i>Nocardiopsis gilva</i>	" " "	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> (2006)
<i>Nocardiopsis rhodophaea</i>	" " "	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> (2006)
<i>Nocardiopsis rosea</i>	" " "	0-18 (5-8)	Li <i>et al.</i> (2006)
<i>Nocardiopsis salina</i>	" " "	3-20 (10)	Li <i>et al.</i> (2004a)
<i>Nocardiopsis aegyptia</i>	Sédiments marins (Egypte).	5-30	Sabry <i>et al.</i> (2004)
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	" " "	10	Li <i>et al.</i> (2003a)
<i>Nocardiopsis halotolerans</i>	Sols salés du Koweit.	0-15 (10)	Al Zarban <i>et al.</i> (2002a)
<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	Marais salant (Corée).	3-20 (5-15)	Chun <i>et al.</i> (2000)
<i>Nocardiopsis halophila</i>	Sols salés (Irak).	3-20 (5-15)	Al Tai et Ruan (1994)
<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	Sols salés (Espagne).	5-10 (7)	Yassin <i>et al.</i> (1993)
<i>Streptomonospora alba</i>	Sols du Xinjiang (Chine)	5-25 (10-15)	Cui <i>et al.</i> (2001)
<i>Streptomonospora salina</i>	" " "	15	Li <i>et al.</i> (2003d)
<i>Streptomonospora halophila</i>	Sols hypersalés (Chine).	5-20 (10)	Cai <i>et al.</i> (2008)
<i>Streptomonospora amylolytica</i>	" " "	" "	Cai <i>et al.</i> (2009)
<i>Streptomonospora flavabla</i>	" " "	" "	" "
<i>Thermobifida halotolerans</i>	Mine salée (Chine)	0-15%	Yang <i>et al.</i> (2008)

Figure 5. Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre la majorité des espèces de *Nocardiopsis*, établi sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, et construit à partir des distances d'évolution par la méthode du "neighbor-joining". La barre indique 0,005 substitution par position de nucléotide. Les numéros des séquences des souches sont donnés entre parenthèses. En gras les espèces halophiles.

2.2.1.2. Espèces du genre *Streptomonospora*

Le genre *Streptomonospora* regroupe cinq espèces halophiles: *Streptomonospora salina* (Cui *et al.*, 2001), *S. alba* (Li *et al.*, 2003d), *S. halophila* (Cai *et al.*, 2008), *S. amylolytica* et *S. flavalba* (Cai *et al.*, 2009) (tableau 6a).

2.2.1.3. Espèce du genre *Thermobifida*

Le genre *Thermobifida* contient une seule espèce halotolérante, *Thermobifida halotolerans* (Yang *et al.*, 2008) (tableau 6a).

2.2.1.4. Espèce du genre *Haloactinospora*

Un actinomycète halophile a été isolé d'un lac salé du Xinjiang (Chine). Il a été identifié à un nouveau genre de la famille des *Nocardioseae*, avec une seule espèce, *Haloactinospora alba* (Tang *et al.*, 2008) (tableau 6a).

2.2.2. Famille des *Pseudonocardiaceae*

La famille des *Pseudonocardiaceae* a été créée par Stackebrandt *et al.* (1997). Elle comprend 19 genres dont quatre seulement contiennent des espèces halophiles. Il s'agit d'*Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* et *Prauserella* (tableau 6b).

2.2.2.1. Espèces du genre *Saccharomonospora*

Le genre *Saccharomonospora* (Nonomura et Ohara, 1971) contient neuf espèces (figure 6), dont quatre sont halophiles: *Saccharomonospora halophila*, première espèce halophile de ce genre (Al Zarban *et al.*, 2002b), *S. paurometabolica* (Li *et al.*, 2003b), *S. iraqiensis* (Tang *et al.*, 2007, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/12> données non publiées), *S. salina* (Syed *et al.*, 2008) et *S. marina* (Liu *et al.*, 2010). *S. iraqiensis* a été classée auparavant en tant qu'*Actinopolyspora iraqiensis* (Ruan *et al.*, 1994).

2.2.2.2. Espèces du genre *Saccharopolyspora*

Ce genre comprend 21 espèces, dont seulement quatre sont halophiles: *Saccharopolyspora halophila* (Tang *et al.*, 2009a), *S. qijiaojingensis* (Tang *et al.*, 2009b), *S. salina* (Suthindhiran *et al.*, 2009) et *S. lacisalsi* (Guan *et al.*, 2011a).

2.2.2.3. Espèces du genre *Prauserella*

Au total, sept espèces halophiles ont été décrites: *Prauserella halophila*, *P. alba* (Li *et al.*, 2003c), *P. salsuginis*, *P. flava*, *P. aidingensis*, *P. sediminis* (Li *et al.*, 2009) et *P. marina* (Wang *et al.*, 2010) (tableau 6b).

2.2.3. Famille des *Actinopolysporaceae*

2.2.3.1. Espèces du genre *Actinopolyspora*

Ce genre comprend cinq espèces halophiles: *Actinopolyspora halophila*, première espèce halophile extrême isolée par Gochnauer *et al.* en 1975, *A. mortivallis* isolée des sols de la Vallée de la mort, USA (Yoshida *et al.*, 1991), *A. xinjiangensis* (Guan *et al.*, 2010), *A. alba* et *A. erythraea* (Tang *et al.*, 2011a) (figure 6) (tableau 6b).

2.2.3.2. Espèces appartenant à d'autres genres

De nombreuses espèces d'actinomycètes halophiles ou surtout halotolérantes appartenant au genre *Streptomyces* ont été citées dans la littérature, en particulier dans le Manuel de Systématique de Bergey (1974) dans le cas d'espèces halotolérantes (tableau 6c). On peut citer aussi quelques espèces halophiles telles que *Streptomyces labedae* (Lacey, 1987), *S. naganishii* (poussent à 7% de NaCl), *S. michiganensis* (pousse à 7-10% de NaCl) (Sonya *et al.*, 2005), ainsi que *S. aureomonopodiales* DKDVIT2 et *Streptomyces* sp. DKDVIT3 (Deepika et Kannabiran, 2009a). Le genre *Micromonospora* est aussi cité comme genre contenant des espèces halophiles (Sudnitsyn, 2008), ainsi que *Haloactinopolyspora* (famille des *Jiangellaceae*) dont les souches poussent à 7-23% de NaCl (Tang *et al.*, 2011b), *Haloglycomyces* (Guan *et al.*, 2009) et *Glycomyces* (Guan *et al.*, 2011b).

III. APERÇU SUR L'ÉCOLOGIE DES ACTINOMYCETES

1. Actinomycètes en général

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre dans la plupart des niches écologiques. La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes: air, composts, eaux, fourrages, fumiers, grains de céréales, systèmes d'air climatisé, poussière de maison, foin et pailles, résidus fibreux de canne à sucre, pollen des plantes et bien d'autres substrats (Lacey, 1973; Breuillard *et al.*, 1974; Couch et Bland, 1974; Goodfellow et Williams, 1983; Jensen *et al.*, 1991; Lacey, 1997; Groth *et al.*, 1999).

Tableau 6b. Liste des espèces d'actinomycètes halophiles appartenant aux familles des *Pseudonocardiaceae*, *Actinopolysporaceae*, *Glycomycetaceae* et *Jiangellaceae*.

	Espèces	Origine	Gamme et optimum de NaCl (%)	Référence
1	<i>Amycolatopsis marina</i>	Sédiments océaniques (Chine).	8-15	Bian <i>et al.</i> (2009)
	<i>Saccharomonospora halophila</i>	Sols du Koweït.	10-30 (10)	Al Zarban <i>et al.</i> (2002b)
	<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	Sols du Xinjiang (Chine).	5-20 (10)	Li <i>et al.</i> (2003b)
	<i>Saccharomonospora iraqiensis</i>	Échantillon de sol irakien.	5-20 (10-15)	Tang <i>et al.</i> (2007)
	<i>Saccharomonospora salina</i>	Échantillon de sol indien.	10	Syed <i>et al.</i> , (2008)
	<i>Saccharomonospora marina</i>	Sédiment océanique en Chine.	3	Liu <i>et al.</i> (2010)
	<i>Saccharopolyspora halophila</i>	Lac salé du Xinjiang (Chine).	10-15	Tang <i>et al.</i> (2009a)
	<i>Saccharopolyspora salina</i>	Sol marin du Bengale (Inde).	8-18 (9)	Suthindhiran and Kannabiran (2009).
	<i>Saccharopolyspora qijiaojingensis</i>	Lac salé du Xinjiang (Chine).	6-22	Tang <i>et al.</i> (2009b)
	<i>Saccharopolyspora lacisalsi</i>	" " "	5-25 (15)	Guan <i>et al.</i> (2011a)
	<i>Prauserella halophila</i>	Sols salés du Xinjiang (Chine).	0-25 (10-15)	Li <i>et al.</i> (2003c)
	<i>Prauserella alba</i>	" " "	5-25 (10-15)	Li <i>et al.</i> (2003c)
	<i>Prauserella aidingensis</i>	Lacs salés "	15-20	Li <i>et al.</i> (2009)
	<i>Prauserella flava</i>	" " "	" "	" "
	<i>Prauserella salsuginis</i>	" " "	" "	" "
<i>Prauserella sediminis</i>	" " "	" "	" "	
<i>Prauserella marina</i>	Sédiments océaniques (Chine).	3	Wang <i>et al.</i> (2010)	
2	<i>Actinopolyspora halophila</i>	Milieu de culture à 25% d NaCl.	10-25 (10-15)	Gochner <i>et al.</i> (1975)
	<i>Actinopolyspora mortivallis</i>	Échantillon de sol de la Vallée de la mort (USA).	5-30 (10-15)	Yoshida <i>et al.</i> (1991)
	<i>Actinopolyspora xinjiangensis</i>	Lac salé et gisements de sel du Xinjiang (Chine).	8-25 (10-15)	Guan <i>et al.</i> (2011a)
	<i>Actinopolyspora alba</i>	" " "	5-25 (15)	Tang <i>et al.</i> (2011a)
	<i>Actinopolyspora erythraea</i>	" " "	" "	" "
3	<i>Haloglycomyces albus</i>	Habitat hypersalé du Xinjiang (Chine).	(8-12)	Guan <i>et al.</i> (2009)
	<i>Glycomyces halotolerans</i>	" " "	4-5	Guan <i>et al.</i> (2011b)
4	<i>Haloactinopolyspora alba</i>	Lac salé du Xinjiang (Chine).	(7-23)	Tang <i>et al.</i> (2011b)

*1. *Pseudonocardiaceae*; 2. *Actinopolysporaceae*; 3. *Glycomycetaceae*; 4. *Jiangellaceae*.



Figure 6. Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre les différentes espèces de *Saccharomonospora* et d'*Actinopolyspora* établi sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, et construit à partir des distances d'évolution par la méthode du "neighbor-joining".

Ne sont donnés que les pourcentages supérieurs à 50%. La barre indique 0,5 substitution par position de nucléotide. Les numéros des séquences des souches sont donnés entre parenthèses. *Rubrobacter radiotolerans* a été utilisée comme "Out Group". En gras = espèces halophiles.

Tableau 6c. Liste de quelques espèces d'actinomycètes halotolérantes appartenant à la famille des Streptomycetaceae et au genre Streptomyces (Pridham et Tresner, 1974).

Espèces	Gamme de NaCl (%)
<i>Streptomyces alboniger</i>	0-13
<i>Streptomyces albovinaceus</i>	0-7
<i>Streptomyces clavifer</i>	0-13
<i>Streptomyces galtieri</i>	0-10
<i>Streptomyces bobili</i>	0-7
<i>Streptomyces albus</i>	0-15
<i>Streptomyces albus</i> subsp, <i>pathocidicus</i>	0-7
<i>Streptomyces aminophilus</i>	0-15
<i>Streptomyces cacaoi</i>	0-15
<i>Streptomyces rimosus</i>	0-13
<i>Streptomyces varsoviensis</i>	0-15
<i>Streptomyces achromogenes</i>	0-10
<i>Streptomyces herbaricolor</i>	0-4
<i>Streptomyces indigoferus</i>	0-4
<i>Streptomyces limocidini</i>	0-10
<i>Streptomyces narbonensis</i>	0-7
<i>Streptomyces showdonensis</i>	0-7
<i>Streptomyces tanashiensis</i>	0-7
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	0-10
<i>Streptomyces galaticus</i>	0-10
<i>Streptomyces halstedii</i>	0-10
<i>Streptomyces nigrifaciens</i>	0-10
<i>Streptomyces nitrosporeus</i>	0-10
<i>Streptomyces cirratus</i>	0-7
<i>Streptomyces eurythermus</i>	0-10
<i>Streptomyces galilaeus</i>	0-7
<i>Streptomyces griseoruber</i>	0-7
<i>Streptomyces kursanovii</i>	0-7
<i>Streptomyces luteogriseus</i>	0-10
<i>Streptomyces massasporeus</i>	0-10
<i>Streptomyces mirabilis</i>	0-4
<i>Streptomyces naganishii</i>	0-10
<i>Streptomyces resistomycificus</i>	0-7
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	0-7
<i>Streptomyces iakyrus</i>	0-10
<i>Streptomyces lucensis</i>	0-10
<i>Streptomyces pilosus</i>	0-10
<i>Streptomyces argenteolus</i>	0-7
<i>Streptomyces aurefaciens</i>	0-4
<i>Streptomyces avellaneus</i>	0-4
<i>Streptomyces carnosus</i>	0-13
<i>Streptomyces coelicolor</i>	0-10
<i>Streptomyces corchorusii</i>	0-4
<i>Streptomyces endus</i>	0-10
<i>Streptomyces griseoluteus</i>	0-13
<i>Streptomyces humidus</i>	0-7
<i>Streptomyces fragilis</i>	0-7

La majorité des actinomycètes est saprophyte, mais quelques-uns peuvent être pathogènes ou symbiotes de plantes ou d'animaux (Williams *et al.*, 1983; Suzuki *et al.*, 1994).

2. Actinomycètes halophiles

Les actinomycètes halophiles et halotolérants sont largement distribués dans différents habitats tels que les déserts, les marais salants, les mines salées, les lacs hypersalés, les étangs, les aliments, les mangliers, etc. Ils sont rencontrés surtout dans les sols salés et hypersalés (Ventosa, 1988; Senthilkumar, 2003).

La plupart des espèces d'actinomycètes halophiles a été isolée durant ces cinq dernières années à partir de divers habitats salés, surtout de Chine (sols salés, lacs salés, sédiments océaniques, mers, etc.) (voir tableaux 6a,b).

La microflore des sols salés et hypersalés est plus proche de celle des sols non salés que de la microflore des eaux hypersalées. Ceci donne à penser que les caractéristiques générales de l'environnement sont plus importantes dans la détermination de la microflore des habitats particuliers que les facteurs individuels tels que le niveau élevé de salinité.

3. Mécanisme d'adaptation aux conditions salines

Pour s'adapter aux conditions salines, les bactéries halophiles ont développé diverses stratégies pour maintenir leur structure et leurs fonctions cellulaires. Il s'agit notamment de l'accumulation d'osmolytes comme l'ectoïne et l'hydroxyectoïne, ainsi que la glycine-bétaïne (Vargas *et al.*, 2008). Dans ce cas, le NaCl est exclu dans le milieu extracellulaire et en même temps, il y a synthèse de substances osmorégulatrices. Ces dernières sont accumulées dans le cytoplasme à une concentration supérieure à 1 moles/Kg d'eau. Elles n'interagissent pas avec les métabolites cellulaires mais elles servent purement à une fonction osmotique en permettant une rapide adaptation à différentes concentrations de NaCl; la machinerie enzymatique est ainsi préservée. Ce type d'adaptation semble s'étendre chez les eubactéries halophiles (Galinski et Truper, 1994).

IV. IMPORTANCE BIOTECHNOLOGIQUE DES ACTINOMYCETES NON HALOPHILES ET HALOPHILES

Les actinomycètes sont d'une grande importance dans les processus biotechnologiques. Ceci est dû à leur capacité de produire un nombre important d'antibiotiques ainsi que d'autres métabolites secondaires bioactifs. Une attention particulière a été focalisée sur les actinomycètes qui poussent dans les conditions extrêmes, parmi lesquels on distingue les actinomycètes halophiles qui représentent un potentiel de biosynthèse intéressant et profitable de substances bioactives utilisables dans divers domaines.

1. Domaines pharmaceutiques: production d'antibiotiques et d'autres substances bioactives

Bien que les études sur les actinomycètes halophiles soient peu nombreuses dans le monde (Javor, 1989; Ventosa *et al.*, 1998; Sivakumura, 2001; Chen *et al.*, 2010b), ces microorganismes demeurent l'une des principales sources de substances naturelles bioactives à usage thérapeutique (Jensen et Finical, 2000). Pour les actinomycètes non halophiles, la majorité des composés sécrétés présente une ou plusieurs activités biologiques et beaucoup d'entre eux ont été utilisés dans le traitement de plusieurs maladies chez l'homme, les animaux et les plantes (Bernan *et al.*, 1997). La recherche de nouveaux actinomycètes constitue une composante essentielle à la découverte de médicaments à base de produits naturels et à large spectre d'activité biologique, tels que les antibiotiques antibactériens et antifongiques et les substances toxiques, cytotoxiques, neurotoxiques, antimitotiques, antivirales et anticancéreuses (Newman et Cragg, 2007; Williams, 2009; Chen *et al.*, 2010b). Récemment, de nouveaux objectifs ont été ajoutés au dépistage général: la recherche de nouvelles molécules actives contre le sida, l'immunosuppression, la maladie d'Alzheimer, le processus de vieillissement et certaines maladies tropicales; ces objectifs visent à la découverte de plusieurs médicaments (Parthasarathi *et al.*, 2011).

La prévalence de la résistance aux composés antimicrobiens chez les agents pathogènes augmente à un rythme alarmant à travers le monde (Singer *et al.*, 2003). Les antibiotiques tels que l'imidazole, composé qui est actuellement utilisé pour traiter les infections dues à des dermatophytes, possèdent une série de limitations tels que les effets secondaires indésirables ou le développement rapide de la résistance (Barrett, 2002). En conséquence, de nouveaux agents antifongiques, de préférence d'origine naturelle avec de nouveaux mécanismes d'action et sans effets secondaires, sont nécessaires pour améliorer le traitement des infections superficielles fongiques (Latte et Kolodziej, 2000). A ce titre, on peut citer la production d'antidermatophytes par

des *Streptomyces* halophiles isolés des marais salants en Inde; il s'agit de *Streptomyces orientalis* DKDVIT1, *Streptomyces aureomonopodiales* DKDVIT2 et *Streptomyces* sp. DKDVIT3 (Deepika et Kannabiran, 2009b).

Les résultats de criblages intensifs ont permis la découverte d'environ 16 500 antibiotiques dont beaucoup ont trouvé des applications en médecine humaine et vétérinaire, et en agriculture. La plupart d'entre eux sont produits par les actinomycétales soient, 8 700 antibiotiques et en particulier *Streptomyces*, (6 550 antibiotiques) et par les actinomycètes peu fréquents ou rares, soient 2250 antibiotiques (Bérdy, 2005). Les antibiotiques sécrétés sont très diversifiés: aminosides, macrolides, peptides, polyènes, polyéthers, tétracyclines, etc. Pour prévenir l'émergence exponentielle des microorganismes résistants aux antibiotiques cliniquement disponibles qui sont déjà commercialisés, le remplacement périodique des antibiotiques existants est nécessaire (Parthasarathi *et al.*, 2011).

2. Production d'enzymes

Les bactéries halophiles se sont révélées être productrices d'une grande variété d'enzymes hydrolytiques telles que les protéases, les amylases, les xylanases, les cellulases, les lipases et les DNases. Ces enzymes sont couramment utilisées dans la production d'aliments fermentés et comme compléments alimentaires dans l'alimentation animale, dans les détergents à lessive et dans les industries de textiles. Plusieurs études ont montré que les enzymes provenant des eubactéries halophiles et halotolérantes ne sont pas seulement halostables mais peuvent aussi être thermostables et alcalistables. Ces caractéristiques rendent les enzymes candidates dans divers domaines de la biotechnologie, ce qui pourrait ouvrir de nouvelles possibilités d'application (Setati, 2010). Bien que ces enzymes halophiles effectuent les mêmes fonctions que leurs homologues non halophiles, elles peuvent catalyser des réactions dans des conditions différentes, telles que les environnements de forte salinité, donc la production d'enzymes résistantes aux sels.

Les amylases sont très utilisées dans différentes applications biotechnologiques, et surtout dans l'industrie alimentaire, comme par exemple l'industrie du pain, pour améliorer le volume, la couleur et la douceur de la pâte (Gupta *et al.*, 2003). Les amylases halophiles ont été produites à partir de bactéries telles que *Streptomyces* sp. D1 (Chakraborty *et al.*, 2009). La stabilité de ces enzymes à des pH et NaCl extrêmes, ainsi que leur capacité de fonctionner de manière optimale à températures élevées font d'elles des candidates attrayantes pour l'hydrolyse de l'amidon dans les procédés industriels qui sont couramment pratiqués à faible activité d'eau, comme la production de sirops et le traitement des solutions salines des eaux usées ou des solutions d'eau contenant des

résidus d'amidon en présence de sel (Margesin et Schinner, 2001). En outre, certaines de ces enzymes halophiles, telles que les amylases de *Streptomyces* sp. D1, restent stable en présence de détergents commerciaux et sont donc utilisées comme additifs (Chakraborty *et al.*, 2009).

Les protéases microbiennes sont les enzymes les plus étudiées et sont très utilisées dans les processus industriels. Elles sont couramment employées comme additifs dans les détergents à lessive, la transformation des aliments et des produits pharmaceutiques, et les réactifs dans les traitements de cuir et de déchets (Amoozegar *et al.*, 2007; Karbalaei-Heidari *et al.*, 2009). Les protéases halophiles ont été isolées et caractérisées à partir de plusieurs bactéries y compris *Nocardiopsis* sp. NCIM 5124 (Dixit et Pan, 2000), *Saccharomonospora halophila*, *Nocardiopsis halotolerans* (AL Zarban *et al.*, 2002c), *Nocardiopsis* sp. 10R (Debananda *et al.*, 2009) et *Streptomyces clavuligerus* (Jignasha et Singh, 2009).

Les bactéries extrêmophiles présentent donc des potentialités biotechnologiques intéressantes et prometteuses. L'amélioration des connaissances sur les mécanismes biologiques de ces bactéries de l'extrême devrait, dans un proche avenir, permettre l'amélioration de nombreux procédés industriels.

La compréhension des principes qui confèrent la stabilité à une forte salinité aux protéines des bactéries halophiles permettrait de concevoir de nouvelles molécules ayant des propriétés catalytiques améliorées.

3. Production de biosurfactants

Des actinomycétales halophiles producteurs de biosurfactants ont été rapportés par plusieurs auteurs: *Nocardiopsis alba* MSA (Gandhimathi *et al.*, 2009), *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08 (Selvin *et al.*, 2009), *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 (Kiran *et al.*, 2010); *Streptomyces* sp. S1 (Kokare *et al.*, 2007), *Streptomyces orientalis* DKDVIT1 et *S. aureomonopodiales* DKDVIT2 (Deepika et Kannabiran, 2010).

Selon Rosenberg et Ron (2001), les biosurfactants sont divisés en composés à faible poids moléculaire tels que les glycolipides et les lipopeptides et en composés à haut poids moléculaire tels que les polysaccharides, les protéines, les lipopolysaccharides et les lipoprotéines. Ils sont sécrétés dans les bouillons de culture où ils restent adhérents à la surface des cellules microbiennes. Ils sont utilisés comme une alternative pour les produits chimiques tensioactifs et sont très utiles dans l'agriculture, l'alimentation, l'industrie des soins de santé et les cosmétiques (Kokare *et al.*, 2004). En effet, plusieurs importances thérapeutiques et biomédicales (activités antibactériennes,

antifongiques, antimycoplasmiques et antitumorales) ont été rapportées (Comeotra *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2006).

4. Production d'osmorégulateurs ou de solutés compatibles

Sous des conditions de stress salin (conditions hyperosmotiques), les microorganismes halophiles accumulent des composés de faible poids moléculaire, comme les polyols, les acides aminés, les sucres, la glycine-bétaine, la proline, la glutamine et les ectoines et hydroxyectoines, appelées solutés compatibles qui permettent à ces microorganismes de survivre dans des conditions de pression osmotique élevée (Brown, 1976). La bétaine est un osmolyte propre aux bactéries qui tolèrent une forte salinité (Sevrin *et al.*, 1992). Elle est synthétisée généralement chez les bactéries photosynthétiques halotolérantes et modérément halophiles et chez les bactéries méthanogènes, alors que les sucres, comme, le tréhalose, sont des osmolytes majeurs propres aux non halophiles (Strom *et al.*, 1986) mais qu'on peut rencontrer aussi chez les halophiles (Robert, 2005). Les ectoines sont capables de protéger les enzymes, les membranes et le contenu cellulaire contre le stress causé par l'exposition aux concentrations élevées de sel, au chauffage, à la congélation ou à la dessiccation. L'intérêt que porte les chercheurs pour ces substances et leurs différentes applications en biotechnologie est de plus en plus important (Lippert et Galinski, 1992; Yashuhiro *et al.*, 1996; Yashuhiko, 1997; Motitschke *et al.*, 2000). Bien que l'ectoine soit généralement considérée comme un osmoprotecteur, elle a également été signalée comme ayant un rôle essentiel dans la stabilisation des protéines et favorise le repliement de polypeptides dans des conditions dénaturantes (Bursy *et al.*, 2008). Elle est utilisée aussi comme un hydratant en cosmétique et en soins de la peau (Motitschke *et al.*, 2000). Cette molécule est aussi employée comme protecteur des cellules saines lors de la chimiothérapie (Barth, 2000; Prabhu, 2004).

- Exemple d'actinomycètes halophiles producteurs d'ectoine et d'hydroxyectoine: *Nocardiosis halophila* (Roberts, 2005) et *Streptomyces coelicolor* A3 qui pousse à 39°C et à une concentration de NaCl de 0,5 à 1,5 M (Bursy *et al.*, 2008), ainsi que *Actinopolyspora* (Kundu *et al.*, 2008).
- Exemple d'actinomycètes halophiles producteurs de bétaine et de tréhalose: *Actinopolyspora halophila* (Nyyssols, 2001; Roberts, 2005).

5. Production de bioplastics et d'exopolysaccharides

Les bactéries halophiles sont une source de matière plastique biodégradable (qui peut être obtenue avec un rendement élevé) utilisée pour la production de thermoplastiques ("polyesters

biologiques”) avec d’excellentes propriétés, comme une résistance élevée et un faible point de fusion, semblable au polypropylène (Oren, 2002; Singh, 2006). Les bactéries halophiles sont aussi une source de production de phtalates de dibutyle, additifs utilisés dans les matières plastiques (plastifiants) à usage divers: exemple: les phtalates produits par les espèces du genre *Streptomyces* (El Naggar, 1997, Lee, 2000; Roy *et al.*, 2006; Al Bari *et al.*, 2006; Smaoui *et al.*, 2011a; Smaoui *et al.*, 2011b).

Des exopolysaccharides sont aussi produits par les actinomycètes et pourraient être utilisés comme stabilisants, épaississants, gélifiants et émulsifiants, dans les domaines pharmaceutique et alimentaire, dans les peintures, la récupération d’huile, le papier et les textiles (Singh, 2006).

5. Utilisation des actinomycètes halophiles dans la bioremédiation

L’un des problèmes les plus urgents du monde moderne est la décontamination de l’environnement contre les différents résidus de substances toxiques. Les hydrocarbures de pétrole sont les principaux polluants de l’environnement. Aujourd’hui, une grande attention est accordée à la réhabilitation des sols contaminés par du pétrole brut en utilisant des biotechnologies écologiquement sûres. La biorestauration des sols contaminés toxiques est généralement basée sur l’activation de la microflore endémique et l’introduction de microorganismes adaptés à l’environnement (Daane *et al.*, 2001; Chaudhary *et al.*, 2011). À cet égard, l’utilisation de microorganismes extrémophiles, parmi eux halophiles, alkaliphiles et thermophiles, adaptés aux conditions locales de l’environnement, est la plus efficace. L’utilisation d’actinomycètes halophiles capable de décontaminer les sols d’hydrocarbures pétroliers (hexane, benzène, naphtalène, pétrole brut) a fait l’objet d’études qui ont donné des résultats positifs (Margesin et Schinner, 2001b). Les actinomycètes utilisés sont *Nocardiopsis* sp. NCIM 5124 (Dixit et Pant, 2000), *Streptomyces streptomycini* 295H et *Streptomyces* sp. 278H (Gurielidze *et al.*, 2009).

6. Utilisation des actinomycètes dans le domaine agronomique

Les actinomycètes ont un rôle important dans le recyclage de la matière organique grâce à leur capacité de dégrader des substances très dures et incapables d’être décomposées par la plupart des bactéries non mycéliennes et les champignons: polymères complexes, polysaccharides, lignocelluloses, chitine, etc. (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Mccarthy et Williams, 1992). Ils participent donc activement à la fertilisation des sols. Leur pouvoir antagoniste prononcé leur confère un rôle dans la distribution écologique des microorganismes et dans la lutte

biologique contre certains agents phytopathogènes du sol (Goodfellow et Williams, 1983). Certains antibiotiques sécrétés par les actinomycètes ont trouvé une application dans la lutte contre quelques maladies des plantes, comme c'est le cas de la kasugamycine, des polyoxines et de la blasticidine. Ces antibiotiques sont utilisés depuis longtemps et à grande échelle dans l'agriculture japonaise, notamment contre certaines maladies du riz (Misato, 1982). *Frankia* est un genre fixateur de l'azote atmosphérique vivant en symbiose dans les racines de plantes dicotylédones arbustives autres que les légumineuses, comme le *Casuarina*, l'aulne, l'orme, etc. (Becking, 1974; Lechevalier, 1981; Sarma *et al.*, 2003). Les actinomycètes sont également responsables en grande partie de l'odeur caractéristique de la terre en raison de la production de géosmine et d'un mélange de composés tels que l'acide acétique, l'acétaldéhyde, l'alcool éthylique, l'alcool isobutylique et l'ammoniaque (Gerber et Lechevalier, 1965; Gottlieb, 1973).

Une autre application biotechnologique potentiellement intéressante est le clonage dans les plantes des zones arides, de gènes structuraux et régulateurs responsables de la synthèse de solutés osmorégulateurs permettant d'augmenter le taux de tolérance de ces plantes aux sels dans les sols salés.

Les premières tentatives sur le clonage de gènes pour les solutés biocompatibles en usine ont donné des résultats encourageants. Les plantes clonées ont acquis un caractère de résistance au sel et sont capables de croître en présence d'une forte salinité (Singh *et al.*, 2008).

V. ANTIBIOTIQUES ET ACTINOMYCETES PRODUCTEURS

1. Aperçu sur l'histoire des antibiotiques

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires généralement synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase) (Bu'lock, 1965).

L'histoire des antibiotiques débute avec la découverte du premier produit à activité antibiotique, l'acide mycophénolique (Gosio, 1896 *In*: Gottlieb et Shaw, 1975) qui s'est révélé être actif contre *Bacillus anthracis*, agent responsable de la maladie du charbon. La découverte de la pénicilline (Fleming, 1929, *In*: Derderian, 2007) a ouvert la voie à d'autres recherches et elle a été rapidement suivie par la découverte d'un grand nombre d'antibiotiques à partir de microorganismes en particulier les actinomycètes.

La période allant de 1944 à 1960, appelée "âge d'or des antibiotiques", fut marquée par la mise en évidence des principaux antibiotiques, tels que la streptomycine (1944), la chlortétracycline

(1945), le chloramphénicol (1947), la néomycine (1949), l’oxytétracycline (1950), etc. Cette période est caractérisée par le développement des premières méthodes de screening (Clardy *et al.*, 2009).

La période entre 1960 et 1970 fut celle de la fabrication des antibiotiques semi-synthétiques, obtenus par modifications chimiques ou enzymatiques des molécules naturelles.

L’antibiothérapie se trouva par la suite confrontée aux problèmes des effets secondaires des traitements et aux phénomènes de résistance de plus en plus importants des souches pathogènes.

Durant les années 70, l’amélioration des méthodes de criblage et des techniques de purification des antibiotiques et la diversité des genres de microorganismes producteurs, a conduit à l’augmentation du nombre d’antibiotiques nouveaux (Peláez, 2006). En 2005, le nombre d’antibiotiques naturels d’origine microbienne avoisine les 16 500 molécules (Bérdy, 2005) et récemment le nombre atteint 20 000 molécules (Marinelli et Marcone, 2011).

2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques constituent un groupe hétérogène de molécules biologiquement actives présentant différentes structures chimiques. Ils peuvent être classés selon plusieurs critères: la structure chimique, l’origine, le mécanisme d’action et le spectre d’action (Bérdy *et al.*, 1987; Yala *et al.*, 2001).

2.1. Classification d’après la structure chimique

Près de 7000 molécules ont été classées par Bérdy *et al.* (1987) dans 9 familles et dans de nombreuses sous familles et ce, d’après leur structure chimique assez proche (tableau 7).

2.2. Autres classifications

Les antibiotiques peuvent être classés d’après plusieurs autres critères:

- **Classification d’après le spectre d’action:** spectre très large (céphalosporines, tétracyclines et chloramphénicol), spectre large (streptomycine, rifampicine et fosfomycine), spectre moyen (pénicilline, érythromycine, lincomycine et novobiocine) et spectre étroit, sur les bactéries (vancomycine, polymyxines) et sur les champignons (cycloheximide, amphotéricine B et nystatine).
- **Classification d’après leur type d’action:** bactériostatique (chloramphénicol, actinomycine érythromycine) et bactéricides sur les bactéries en phase de croissance (pénicilline, céphalosporine et fosfomycine) et en phase de croissance et stationnaire (streptomycine et

Tableau 7. Classification des antibiotiques d’après leur structure chimique (Bérdy et al., 1987).

Antibiotiques contenant des glucides	<ul style="list-style-type: none"> - Glucides purs - Aminoglycosides - Glycopeptides 	<ul style="list-style-type: none"> - Nojirimycine - Streptomycine, gentamicine, kanamycine. - Vancomycine, ristocétine
Lactones macrocycliques	<ul style="list-style-type: none"> - Macrolides - Polyènes - Macrolactames 	<ul style="list-style-type: none"> - Erythromycine, spiramycine - Nystatine, amphotéricine - Maytansine
Quinones et antibiotiques apparentés	<ul style="list-style-type: none"> - Composés polycycliques linéairement accolés - Anthraquinones - Naphtoquinones - Benzoquinones 	<ul style="list-style-type: none"> - Tétracyclines - Anthracyclines - Rubomycine - Mitomycine, saframycine
Acides aminés et peptides	<ul style="list-style-type: none"> - Dérivés d’acides aminés - Homopeptides - Depsipeptides - Lipopeptides 	<ul style="list-style-type: none"> - Pénicilline, cyclosérine - Bacitracine - Valinomycine - Polymyxines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l’azote	<ul style="list-style-type: none"> - Hétérocycles non accolés - Hétérocycles condensés 	<ul style="list-style-type: none"> - Mildiomycine - Phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l’oxygène	<ul style="list-style-type: none"> - Dérivés du furane - Polyéthers 	<ul style="list-style-type: none"> - Monensine
Antibiotiques aromatiques	<ul style="list-style-type: none"> - Composés benzéniques - Composés aromatiques condensés - Autres dérivés 	<ul style="list-style-type: none"> - Chloramphénicol - Griséofulvine - Novobiocine
Antibiotiques alicycliques	<ul style="list-style-type: none"> - Dérivés du cyclo-alcane - Terpènes - Oligoterpènes 	<ul style="list-style-type: none"> - Cycloheximide - Acide marasmique - Acide fusidique
Antibiotiques aliphatiques	<ul style="list-style-type: none"> - Dérivés d’alcanes - Dérivés des acides carboxyliques aliphatiques - Composés contenant du phosphore 	<ul style="list-style-type: none"> - Elaiomycine - Céruléline - Fosfomycine

polymyxine). Certains antibiotiques sont fongicides et d'autres, fongistatiques.

- **Classification d'après leur origine:** provenance de bactéries non mycéliennes (bacitracine et polymyxines), de champignons (pénicillines, céphalosporines et griséofulvine) ou d'actinomycètes (la majorité des antibiotiques, sécrétés surtout par le genre *Streptomyces*).
- **Classification d'après leur mode d'action:** on distingue ainsi les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne (pénicillines, céphalosporines, novobiocine et cyclosérine), les antibiotiques actifs sur la membrane plasmique des bactéries (polymyxines, bacitracine et tyrothricine) ou des champignons (polyènes antifongiques), les antibiotiques actifs sur les acides nucléiques (mitomycine et actinomycine) et les antibiotiques actifs sur la synthèse protéique (tétracycline, érythromycine et chloramphénicol).

2.3. Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être produits par divers microorganismes, parmi lesquels, près de 17% sont synthétisés par les bactéries non mycéliennes, 38% par les champignons et environ 45% par les actinomycètes (Demain, 2009).

Plusieurs antibiotiques peuvent être produits par un même microorganisme et inversement divers microorganismes taxonomiquement éloignés peuvent synthétiser le même antibiotique comme c'est le cas de l'acide fusidique (traitement d'infection à staphylocoques) isolé à partir des genres *Fusidium*, *Cephalosporium*, *Microsporium*, *Mucor* et *Chrysosporum* (Von Daehne *et al.*, 1984).

2.3.1. Actinomycètes

Le genre *Streptomyces* est à l'origine du plus grand nombre de molécules actives connues; près de 75,3% des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes sont synthétisés par ce genre (Bérdy 2005).

2.3.2. Bactéries non mycéliennes

Les bactéries non mycéliennes produisent environ 17% des antibiotiques d'origine microbienne, dont 13% sont sécrétés par les *Bacillaceae* (ex.: *Bacillus*) et 3,9% par les *Pseudomonadaceae* (ex.: *Pseudomonas*). Ces antibiotiques sont souvent de nature peptidique ou parfois aminoglycosidique, hétérocyclique, lipidique, etc. (ex.: bacitracine, polymyxine, etc.). D'autres bactéries de genres très divers en produisent également (0,1%), tels que *Myxobacter* et *Cyanobacter* (Bérdy, 2005).

2.3.3. Champignons

Parmi les 12 500 espèces de champignons décrites, environ 2000 sont productrices d'antibiotiques. Le nombre d'antibiotiques d'origine fongique était déjà de 4900 en 2005. Ces champignons sont pour la plupart des ascomycètes ou des formes imparfaites (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*). Certains basidiomycètes (*Ganoderma* et *Aureobasidium*) et myxomycètes peuvent également en produire (Bérdy, 2005).

3. Production, purification et identification des antibiotiques

3.1. Production

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires dont la synthèse démarre souvent à la fin ou après la phase de croissance, à l'idiophase, et se poursuit pendant la phase stationnaire.

Cependant, dans certains cas, cette production peut débuter durant la phase exponentielle de croissance (Lebrihi *et al.*, 1987; Zitouni *et al.*, 2004a). Comme les besoins nutritionnels et les conditions de culture d'un microorganisme ne sont généralement pas les mêmes pendant la phase de croissance et pendant la phase de production des métabolites secondaires, des milieux favorables ont dû être développés et certains paramètres d'ordre nutritionnel et environnemental ont été régulés afin d'offrir les conditions optimales de production d'antibiotiques (Larpent et Sanglier, 1989). Ces paramètres concernent:

- Certains composants du milieu de culture tels que le choix et les proportions des sources de carbone, d'azote, de phosphate inorganique, ainsi que d'autres sels inorganiques, des oligoéléments, des précurseurs et d'autres facteurs.
- Les conditions de culture, le choix du pH, de la température, de l'aération et de la vitesse d'agitation.

La production d'antibiotiques peut parfois être sous l'influence de certaines substances tels que le glucose, les phosphates et les ions ammonium qui peuvent ainsi exercer un effet répressif en relation avec la concentration utilisée et en relation aussi avec l'antibiotique produit (Larpent et Sanglier, 1989).

D'autres éléments exercent un effet positif sur la croissance et la production d'antibiotiques, comme c'est le cas du CaCO_3 dans la plupart des milieux de culture, pour favoriser la croissance des actinomycètes et inhiber la croissance fongique (Isshiki *et al.*, 1989; Igarashi *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 2000).

De même les manipulations par génie métabolique de fonctions enzymatiques bien ciblées des souches ont permis l'amélioration des potentialités productrices de ces souches, grâce à l'emploi de la technologie de l'ADN recombiné.

3.2. Purification

L'étude des antibiotiques ou d'autres substances naturelles nécessite plusieurs techniques et étapes d'extraction et de purification. Celles-ci varient en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules étudiées.

Cependant, une première étape d'extraction des produits actifs du filtrat de culture est réalisée par des solvants organiques de polarités différentes.

L'extrait brut est alors traité en chromatographie soit:

- sur papier ou sur couche mince (CCM).
- sur colonne à basse pression et/ou encore à haute pression (HPLC).

Après la séparation des différentes fractions, des révélations microbiologiques (antibiographies et bioautographies) et chimiques sont réalisées afin de repérer les différents antibiotiques, et avoir certaines informations sur leur nature pour faciliter après leur purification.

La détermination de la structure chimique des antibiotiques est la résultante de plusieurs données obtenues après analyses spectroscopiques, chimiques, physicochimiques et chromatographiques.

Quelques analyses spectroscopiques (UV-visible et infra rouge) sont utilisées pour détecter certains groupements chimiques ou encore certaines familles d'antibiotiques, tels que les polyènes à spectre d'absorption caractéristiques en UV-visible (Chan et Aazzalos, 1987). Cependant, d'autres techniques d'analyses ont contribué à la détermination de la structure complète des antibiotiques. Parmi ces techniques, nous avons:

- l'analyse élémentaire qui nous renseigne sur les éléments (nombre d'atomes de carbone, d'azote, d'oxygène, d'hydrogène, etc.) composant les antibiotiques.
- la spectrométrie de masse qui nous donne la masse moléculaire des antibiotiques et nous conduit parfois même à la formule chimique des molécules, en comparaison avec des profils de molécules répertoriées. L'analyse fine des différents fragments de masse obtenus est très importante.
- la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13 est l'étape la plus importante avec la spectrométrie de masse pour la caractérisation définitive des molécules

d'antibiotiques. Les analyses de RMN permettent d'aboutir à la structure chimique complète des antibiotiques.

4. Mode d'action des antibiotiques

4.1. Action sur la membrane plasmique

Les polyènes forment des complexes avec les stérols de la membrane plasmique des cellules eucaryotes, ce qui entraîne une diminution de la perméabilité membranaire. Le métabolisme des cellules est ainsi perturbé après la fuite de certains éléments intracellulaires indispensables. Ces éléments activent les enzymes autolytiques qui s'attaquent à la cellule fongique (Michel-Briand, 1981). Certains champignons, comme le genre *Pythium* (oomycètes), sont résistants aux polyènes du fait de l'absence de stérols dans leur membrane.

D'autres antibiotiques, notamment ceux de la famille des polypeptides, agissent également sur la membrane plasmique bactérienne en se fixant sur les phospholipides (polymyxines) ou en se comportant comme des ionophores faisant rentrer du K^+ dans la cellule (gramicidine) (Caudy et Buxerand, 2005).

4.2. Inhibition de la synthèse de la paroi

Ce sont généralement les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines), la fosfomycine, la cyclosérine, etc., qui inhibent la synthèse pariétale en empêchant l'intégration des acides aminés formant le térapeptide muréique ou en empêchant ce dernier de se coller à la muréine (Caudy et Buxerand, 2005).

4.3. Inhibition de la synthèse des protéines

Plusieurs antibiotiques antibactériens ont comme site d'action les ribosomes et inhibent ainsi la synthèse protéique (tétracyclines, érythromycine, chloramphénicol, etc.). A ce niveau, ils peuvent empêcher la fixation de l'ARN de transfert porteur d'acides aminés, la translocation et la transpeptidation. D'autres (ex.: streptomycine) provoquent des erreurs de lecture du code génétique. Chez les eucaryotes, la synthèse des chaînes polypeptidiques est arrêtée par la fixation de la kasugamycine sur la sous-unité 40S des ribosomes (Gale *et al.*, 1981). La translocation des ribosomes sur l'ARN messager est bloquée par le cycloheximide qui se fixe sur la sous-unité ribosomique 60S (Deacon, 1984). La synthèse des protéines est aussi inhibée par la blasticidine S qui bloque l'incorporation des acides aminés (Caudy et Buxerand, 2005).

4.4. Inhibition de la synthèse des acides nucléiques

La mitomycine et l'acide nalidixique empêchent respectivement la réplication de l'ADN (en se fixant sur les deux brins d'ADN) et sa synthèse (par inhibition de l'incorporation de la thymine). L'actinomycine empêche la transcription de l'ADN en ARN messenger (Caudy et Buxerand, 2005).

4.5. Autres activités

Certains antibiotiques agissent sur l'activité d'une enzyme ou d'un système enzymatique de la cellule, comme par exemple les enzymes du système respiratoire qui sont inhibées par les dérivés de l'imidazole chez les champignons.

5. Résistance aux antibiotiques et intérêt de la recherche de nouveaux antibiotiques

5.1. Les antibactériens

Devant les premières alertes lancées dans les années 60 et 70, les médecins crurent que l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques n'était qu'un phénomène limité qui serait compensé par l'arrivée de nouvelles molécules (Courvalin, 1997). Jusqu'au début des années 80, on pouvait penser que tous les problèmes de pathologie infectieuse bactérienne étaient résolus par l'introduction sur le marché d'antibiotiques particulièrement puissants et variés. En dépit de cette floraison de médicaments, des phénomènes inquiétants de résistance se sont fait jour, faisant craindre le retour à une ère pré-antibiotique (Neu, 1992). Des facteurs ont été incriminés dans cette augmentation de la fréquence de la résistance, telle que la pression de sélection exercée par l'utilisation abusive des antibiotiques (Cohen, 1992).

L'émergence de résistances de plus en plus nombreuses développées par les bactéries face aux antibiotiques pose à l'heure actuelle de très sérieux problèmes. L'arsenal thérapeutique mis à notre disposition avec succès depuis le milieu du XX^{ème} siècle pour combattre les infections bactériennes s'épuise et le nombre de médicaments nouvellement produits continue de diminuer (Donadio *et al.*, 2010). Le phénomène de résistance multiple aux antibiotiques est de plus en plus fréquent à l'échelle mondiale, aussi bien chez les bactéries à Gram positif, que les bactéries à Gram négatif. En 2004, plus de 70% des bactéries pathogènes ont été estimées être résistantes à au moins l'un des antibiotiques, actuellement disponibles (Demain et Sanchez, 2009). Ces dernières années, la résistance aux carbapénèmes, antibiotiques piliers pour le traitement des infections à bactéries à Gram négatif multi-résistantes, en particulier celles productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et l'émergence des souches productrices de carbapénémases (exemple: New Delhi métallobêta-lactamase NDM-1), sont particulièrement préoccupantes (Raghvendra *et al.*, 2011).

Les carbapénémases, ainsi que les autres résistances souvent associées à celles-ci, ont un haut potentiel de dissémination par transfert plasmidique horizontal au sein de différentes espèces d'entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) mais également à d'autres espèces (*Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*) (Deshpande *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, la résistance, conséquence de l'utilisation massive et croissante de ces médicaments, est qualifiée par la plupart de "problème majeur pour la médecine du XXI^{ème} siècle". Les microbes résistants et le manque de nouvelles molécules font craindre aux chercheurs réunis à Boston en 2010 (à l'occasion de la 50^{ème} conférence annuelle de "l'Interscience Conférence on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; ICAAC", une crise sanitaire majeure.

Face à l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, il est nécessaire de trouver de nouvelles molécules actives contre les bactéries pathogènes.

5.2. Les antifongiques

L'augmentation de la fréquence des infections fongiques invasives s'est accompagnée d'une prescription accrue d'antifongiques, polyènes et surtout azolés, avec pour conséquence le développement de résistance. Si les infections candidosiques restent les plus fréquentes, on observe une augmentation des infections aux espèces d'*Aspergillus* et à des *Candida* autres que *C. albicans*, résistantes au fluconazole. De nouveaux agents pathogènes particulièrement résistants commencent à apparaître, comme les espèces *Scedosporium prolificans* et *Aspergillus terreus*, ainsi que les espèces de *Fusarium*. Les études épidémiologiques ont permis d'identifier les facteurs de risque associés à la résistance aux antifongiques. La pression de sélection due à une prescription accrue des azolés est un facteur essentiel (Granier, 2003).

Contrairement aux antibiotiques antibactériens, la recherche de nouveaux antifongiques a progressé lentement (Gupte *et al.*, 2002). Les raisons sont dues au fait que les champignons soient eucaryotes, comme les cellules des mammifères et les agents qui inhibent la biosynthèse des protéines, de l'ARN ou de l'ADN d'un champignon sont également toxiques pour l'hôte (Georgopapadakou et Walsh, 1994). Actuellement, les critères recherchés dans les nouveaux antifongiques sont l'inhibition de la biosynthèse de la paroi, avec une puissance comparable à l'amphotéricine B, une sécurité comparable au fluconazole et une activité fongicide *in vitro* et *in vivo*.

Les champignons sont responsables de nombreuses maladies ciblant les végétaux, l'homme et l'animal. On estime que les 4/5 des maladies des végétaux sont dues à ces microorganismes (Lanier *et al.*, 1976).

Les antifongiques peuvent être naturels ou de synthèse. Les antifongiques naturels sont répartis en deux grands groupes: les antibiotiques polyéniques (polyènes, avec une absorption caractéristique en lumière ultraviolette et visible, entre 260 et 405 nm; en général, trois maxima) (Martin, 1979). Exemple: l'amphotéricine B et la nystatine. Les antifongiques non polyéniques possèdent des structures chimiques très variées. Exemple: les aminoglycosides (kasugamycine), les aromatiques (griséofulvine), les quinones (certaines anthracyclines), les hétérocycles azotés (blasticidine S), les composés alicycliques (cycloheximide), etc.

Les antifongiques polyéniques ont un spectre d'action sur les champignons filamenteux et unicellulaires et sur certains protozoaires et algues. A part quelques rares exceptions, ils sont inactifs sur les bactéries et les virus. Vu leur instabilité, leur toxicité et les problèmes liés à leur absorption, très peu de molécules polyéniques sont utilisées en thérapie.

Partie II

MATERIEL ET METHODES

I. LES MICROORGANISMES

1. Les souches d'actinomycètes halophiles

Une collection du laboratoire, composée de 43 isolats d'actinomycètes halophiles provenant de différents échantillons de sols salés et de différentes régions du Sahara algérien, a fait l'objet de cette étude. Ces isolats proviennent d'El Goléa (latitude, 30°35' N; longitude, 2°53' E; hauteur, 397 m), In Salah (latitude, 27°15' N; longitude, 2°31' E; hauteur, 280 m), Tolga (latitude, 34°43' N; longitude, 5°22' E; hauteur, 237 m), El Oued (latitude, 33°3' N; longitude, 6°47' E; hauteur 62 m), Ouargla (latitude, 31°55' N; longitude, 5°24' E; hauteur, 141 m) et Tamanrasset (Hoggar, sud algérien; latitude, 22° 49' N; longitude, 5° 28' E). Les actinomycètes ont été isolés par suspension-dilution sur milieu chitine-vitamines agar (Hayakawa et Nonomura, 1987). Les origines de chaque souche et la composition du milieu de culture sont données en annexe 1.

2. Microorganismes-cibles

Plusieurs germes-cibles représentant différents types de microorganismes (bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif, champignons et levures) ont été utilisés lors des études d'évaluations des propriétés antagonistes des souches et du pouvoir inhibiteur des antibiotiques étudiés. Ces microorganismes sont:

- Bactéries à Gram positif: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* CIP 6625, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Staphylococcus aureus* CIP 7625 et *Enterococcus faecalis*.
- Bactéries à Gram négatif: *Klebsiella pneumoniae* CIP 8291, *Pseudomonas syringae* n° 1882, *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22, *Agrobacterium tumefaciens* n° 2410, *Serratia marcescens* et *Salmonella enterica* CIP 81.3.
- Levures et champignons: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226, *Candida albicans* IPA 200, *Kluyveromyces lactis* K231, *Botrytis cinerea*, *Mucor ramannianus* NRRL 1829, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA), *Aspergillus alliaceus*, *A. carbonarius* M333, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* ATTC 3174, *Penicillium glabrum* et *Rhizopus nigricans*.

II. ETUDE TAXONOMIQUE DES ACTINOMYCETES HALOPHILES

1. Étude morphologique

1.1. Caractéristiques culturelles

Les caractéristiques culturelles des souches sont déterminées sur les milieux ISP2 et ISP4 (préconisés lors de « l'International *Streptomyces* Project » ou ISP) (Shirling et Gottlieb, 1966), ainsi que sur les milieux TSA (trypticase-soja agar), CMA (milieu complexe agar) (Chun *et al.*, 2000) et amidon-nitrate agar (Al Zarban, 2002a). Ces milieux sont additionnés de NaCl à une concentration de 10%. Après 12 jours d'incubation à 30°C, la croissance, la sporulation, la couleur des mycélium aérien et du substrat, ainsi que celle des pigments diffusibles sont déterminées.

La composition des milieux de culture est donnée en annexe 1. Les différentes couleurs sont définies à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC-NBS).

1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Pour déterminer les structures et la sporulation des genres étudiés, ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat, les fructifications des différentes souches cultivées sur les différents milieux cités précédemment sont observées au microscope photonique Zeiss aux grossissements 10 x 10 et 40 x 10.

2. Étude chimique des constituants cellulaires

Afin de confirmer la détermination des genres, une analyse chimiotaxonomique est nécessaire. Elle consiste à déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique ou DAP (forme LL ou DL) et la présence ou non de glycine au niveau des parois, ainsi que la composition cellulaire en sucres par chromatographie descendante sur papier, la mise en évidence des phospholipides membranaires par chromatographie ascendante sur couche mince de gel de silice (CCM) et la détection des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Pour cela des cultures liquides en agitation rotative (250 rpm) sont lancées dans un shaker à 30°C, pour les différentes souches sur milieu Trypticase Soy Broth (TSB) (voir annexe 1) additionné de 10% de NaCl. Après 3 à 4 jours d'incubation, lorsque les cultures deviennent denses, le mycélium est recueilli, lavé abondamment à l'eau distillée, séché à 30°C durant une nuit puis conservé au congélateur à -20°C en attendant d'effectuer les différentes analyses.

2.1. Détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et détection de la glycine

La méthode utilisée est celle de Becker *et al.* (1964).

Dix milligrammes de mycélium sec sont hydrolysés avec 1 mL de HCl 6 N pendant 18 h à 100°C, dans des tubes hermétiquement fermés. Après refroidissement, les hydrolysats sont filtrés sur membranes en verre puis évaporés à sec dans un bain de sable chaud. Des lavages à l'eau distillée sont effectués jusqu'à l'élimination complète du HCl et l'obtention d'un pH voisin de la neutralité. Le résidu sec obtenu est repris dans 0,3 mL d'eau distillée puis 15 µL sont chromatographiés sur papier Whatman n° 1. Les papiers sont développés durant 18 h par chromatographie descendante (à front perdu) dans un solvant composé de méthanol, d'eau distillée, de HCl 10 N et de pyridine (8-17,5-2,5-10, v/v/v/v). L'acide diaminopimélique (Fluka) qui est un mélange des isomères LL et DL, ainsi que la glycine, sont utilisés comme standards en chromatographiant 10 µL d'une solution à 0,01 M et à 0,2% respectivement. Les chromatogrammes sont révélés par une solution à 0,2 % (w/v) de ninhydrine dans de l'acétone et chauffés durant 2 min à l'étuve à 100°C. Les taches de DAP sont de couleur olive-brunâtre virant au jaune (la forme DL a un Rf de 0,8 par rapport à la forme LL). La glycine est colorée en violet-brun et les autres acides aminés en violet ou en rose.

2.2. Mise en évidence des sucres

Les sucres sont présents au niveau des cellules entières. L'hydrolyse acide (ménagée) est effectuée selon la méthode de Lechevalier et Lechevalier (1970b).

Cinquante milligrammes de mycélium sec sont hydrolysés par 2 mL de H₂SO₄ 1 N pendant 2 h à 100°C, dans des tubes hermétiquement fermés. Après refroidissement, le pH de l'hydrolysate est neutralisé par une solution saturée d'hydroxyde de baryum. Le précipité blanc qui se forme est éliminé par centrifugation (4000 rpm durant 20 min). Le surnageant est recueilli, évaporé à sec à 40°C, puis repris dans 0,3 mL d'eau distillée. Vingt microlitres sont chromatographiés sur papier Whatman n° 1. Le solvant utilisé est la partie supérieure d'un mélange composé de *n*-butanol, eau distillée, pyridine et toluène (5/3/3/4, v/v/v/v). Quinze microlitres des solutions aqueuses de sucres témoins (à 0,1 %) suivants sont chromatographiés: arabinose, galactose, glucose, mannose, ribose, rhamnose et xylose. Les papiers sont développés durant 36 à 48 h par chromatographie descendante à front perdu. Les chromatogrammes sont révélés grâce à une solution acide de phtalate d'aniline (3,25 g d'acide phtalique dissout dans 100 mL de *n*-butanol saturé avec de l'eau distillée, plus 2 mL d'aniline) et en chauffant dans une étuve à 100°C pendant 5 min. Les taches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et brune pour les hexoses.

2.3. Analyse des lipides

2.3.1. Analyse des phospholipides membranaires

La méthode utilisée est celle de Minnikin *et al.* (1977). Un gramme de mycélium est agité durant une nuit à température ambiante dans 40 mL du mélange chloroforme-méthanol (2/1, v/v) contenu dans un Erlenmeyer de 250 mL fermé hermétiquement. Le filtrat est ensuite recueilli et évaporé à sec (à température inférieure à 37°C) puis le résidu est dissout dans 0,3 mL du même solvant. Dix microlitres sont déposés sur couche mince de gel de silice G 60 (plaque de 20x20 cm) puis développés par chromatographie ascendante dans un solvant constitué de chloroforme, de méthanol et d'eau distillée (65/25/4, v/v/v). Des aliquotes de 10 µL des solutions témoins de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) (0,01 g dans 1 mL de chloroforme) sont aussi chromatographiées. Pour chaque échantillon, trois plaques sont développées: l'une est révélée avec le réactif de Dragendorff selon Munier et Macheboeuf (Merck, 1975; voir composition en annexe 1) pour la détection de la PC (couleur orange-jaune), la deuxième, avec une solution de ninhydrine (précédemment décrite) pour la mise en évidence de la PE (couleur violette) et la troisième avec de l'anisaldéhyde-H₂SO₄ (Merck, 1975) pour la détection des phospholipides contenant de la glucosamine (couleur verte).

2.3.2. Analyse des acides gras

L'analyse des acides gras a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse, selon la méthode de Sasser (1990).

2.3.2.1. Extraction des acides gras

Des cultures d'actinomycètes halophiles sont effectuées sur milieu trypticase soy broth (TSB) additionné de 10% de NaCl, en agitation rotative à 150 rpm pendant 3 à 5 jours à 30°C selon la croissance des souches. Une fois les cultures prêtes, elles sont filtrées, puis le mycélium est récupéré, lavé et conservé à -20 °C en attendant la lyophilisation. L'extraction et l'analyse des acides gras se fait en quatre étapes (figure 8):

- **Saponification**

C'est une étape importante; elle permet de libérer les acides gras des autres lipides. Pour cela 1 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (45 g hydroxyde de sodium, 150 mL de méthanol, et 150 mL d'eau distillée) est additionnée à 40 mg de mycélium contenu dans un tube. Le tube est bien scellé, vortexé pendant 5 min et chauffé dans un bain marie à 100 °C pendant 5 min, puis vortexé une seconde fois 5 à 10 secondes avant d'être remis au bain marie à 100 °C pendant 25 min.

- **Méthylation**

Cette étape permet d'obtenir des méthyles esters d'acides gras (pour augmenter leur volatilité dans une colonne partiellement polaire de CPG et diminuer leur solubilité dans la phase aqueuse). Pour cela, 2 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (325 mL d'acide chlorhydrique 6N + 275 mL d'alcool méthylique) sont additionnés au tube précédent. Le tube est bien scellé et vortexé, puis chauffé 10 min à 80 °C. Ceci fait chuter le pH à 1,5 et permet la méthylation des acides gras.

- **Extraction**

L'extraction des méthyles esters d'acides gras se fait avec une phase organique (200 mL de *n*-hexane + de 200 mL de méthyl-ter-butyl-éther ou MTBE utilisable en CPG).

- **Lavage**

Une solution d'hydroxyde de sodium (10,8 g hydroxyde de sodium dissouts dans 900 mL d'eau distillée) est utilisée pour laver la colonne et éviter les contaminations.

2.3.2.2. Détection des acides gras

La détermination des acides gras est effectuée par chromatographie en phase gazeuse, en utilisant une colonne Ultra 2 (A25 m x 0.2 mm) et une colonne capillaire en silice (phényl méthyl silicone). Les conditions chromatographiques sont: température du four progressant de 170°C jusqu'à 270°C à raison de 5°C/min. La détection se fait par ionisation de flamme; le gaz vecteur est l'hydrogène.

2.3. Etude physiologique

Une série de tests physiologiques généralement utilisés par les taxonomistes pour la différenciation des espèces d'actinomycètes, est retenue. Ces tests sont cités ci-après et les méthodes sont détaillées en annexe 1.

Les tests physiologiques réalisés sont les suivants: dégradation de 20 composés organiques divers, recherche de la nitrate réductase, dégradation de 21 sources de carbone, utilisation de l'alanine, proline et sérine (comme sources de carbone et d'azote) et sensibilité à 6 antibiotiques et à divers pH et températures (Goodfellow *et al.*, 1971).

2.3.1. Détermination de la concentration de NaCl optimale pour la croissance

Dans le but de rechercher la concentration optimale en NaCl pour la croissance, nous avons utilisé les milieux CMA et TSA auxquels nous avons additionné du NaCl à des concentrations différentes: 0, 5, 7, 10, 15, 20, 25 et 30%. L'incubation a lieu à 30°C pendant 10 jours.

2.3.2. Production de nitrate réductase

La production de nitrate réductase par les isolats est observée sur le milieu décrit par Marchal et Bourdon (1973).

2.3.3. Tests de dégradation de divers composés organiques

Les tests sont les suivants:

- Hydrolyse de la tyrosine, de l'hypoxanthine, de la xanthine, de l'adénine, de la guanine, de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974), de la gélatine, de l'esculine, de l'arbutine, de l'amidon, du Tween 80 (Marchal *et al.*, 1987) et de la testostérone (Goodfellow, 1971).
- Utilisation des sels de sodium: acétate, benzoate, butyrate, citrate, oxalate, propionate, pyruvate, succinate et tartrate (Gordon *et al.*, 1974).
- Dégradation de 21 glucides et dérivés: ce test consiste à apprécier la croissance des isolats en présence de ces composés comme seules sources de carbone. Le milieu de base utilisé est celui préconisé pour les halophiles (Tomlinson et Hochstein, 1972; Kushner 1989).
- Utilisation de l'alanine, de la proline et de la sérine; ce test consiste à apprécier la croissance des isolats en présence de ces composés comme seules sources de carbone et d'azote. Le milieu de base utilisé est celui utilisé pour les glucides.

2.3.4. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Les tests sont les suivants:

- Sensibilité au lysozyme à 0,005% (Gordon et Barnett, 1977).
- Sensibilité aux pH 5 et pH 9 (sur TSB), aux températures de 30°C et de 45°C et aux antibiotiques (sur TSA) suivants: chloramphénicol (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), érythromycine (15 UI), novobiocine (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), rifampicine (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), streptomycine (10 UI) et vancomycine (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.4. Etude moléculaire des actinomycètes halophiles

Cette étude est basée sur l'extraction et l'amplification par PCR de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S et la détermination de sa séquence. Une fois déterminée, cette dernière est comparée avec celles des espèces de référence.

2.4.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est obtenu à partir de cultures liquides des différentes souches halophiles dans 100 mL de milieu TSB dans un shaker (200 rpm; 30°C). Après 3 à 4 jours de croissance, la culture est

centrifugée puis le mycélium est lavé deux fois à l'eau bi-distillée et récupéré. Le mycélium peut être immédiatement utilisé pour l'extraction de l'ADN ou bien conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

La méthode utilisée pour l'extraction de l'ADN est celle de Liu *et al.* (2000).

- 1- Dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL, mettre 500 µL de la solution de lyse composée de:
Tris-HCl [pH 8,0]: 400 mM; EDTA [pH 8,0]: 60 mM; NaCl: 150 mM; SDS: 1%.
- 2- Ajouter, en dispersant, une petite quantité de mycélium à l'aide d'une spatule ou d'un cure-dent stérile. Laisser pendant 10 min à température ambiante.
- 3- Ajouter 150 µL d'une solution (pH 4,8) composée de 60 mL d'acétate de potassium 5 M, 11,5 µL d'acide acétique glacial et 28,5 µL d'eau distillée (le pH final de cette solution est de 4,8).
Vortexer brièvement et centrifuger à 10 000 rpm pendant 1 min.
- 4- Transvaser le surnageant dans un autre tube Eppendorf et centrifuger comme précédemment.
- 5- Transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf, ajouter un volume égal d'isopropanol.
Mélanger le tube brièvement par inversion, puis centrifuger à 10 000 rpm pendant 2 min.
Éliminer le surnageant.
- 6- Laver l'ADN avec 300 µL d'éthanol à 70%. Centrifuger à 10 000 rpm pendant 1 min. Éliminer le surnageant et sécher le culot (l'ADN) à l'air.
- 7- Re-suspendre le culot dans 50 µL d'eau bidistillée stérile.

2.4.2. Quantification de l'ADN

Pour le contrôle de la pureté de l'ADN, l'échantillon d'ADN est dilué 200 fois dans du tampon TE, puis sa densité optique (DO) est mesurée au spectrophotomètre, à deux longueurs d'ondes différentes.

260 nm: longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques, ADN et ARN.

280 nm: longueur d'onde d'absorption des protéines.

Si le rapport des DO: $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}} \leq 1,8$ contamination par des protéines.

" " $\geq 2,0$ contamination par des ARN.

Le calcul de la quantité d'ADN nous est donné par la formule suivante:

$$[\text{ADN}] = DO_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{facteur de dilution} (\mu\text{g/mL}).$$

Remarque: 1 unité $DO_{260\text{ nm}} = 50 \mu\text{g/mL}$ d'ADN.

2.4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Le produit PCR est détecté et sa taille est déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET) et visualisé par la fluorescence UV.

Le gel est préparé avec 0,8% d'agarose en poudre (DNA grade, Euromedex) dans un tampon TAE 1X (Tris-Acétate, EDTA) (Euromedex). L'ensemble est porté à ébullition pour faire fondre l'agarose. Le gel est ensuite laissé refroidir sans se solidifier pour pouvoir ajouter 0,5 µg/mL de BET (Sigma). Avant de couler le gel, un peigne est placé dans la cuve à électrophorèse. Il ne sera enlevé qu'après solidification du gel et servira à former des puits dans lesquels seront déposés les échantillons.

Le gel horizontal est recouvert du tampon de migration TAE 1X. Chaque échantillon d'ADN sera déposé dans un des puits du gel immergé dans le tampon. Pour que l'échantillon tombe au fond du puit, il sera alourdi avec un tampon de charge contenant 0,25% de bleu de bromophénol (Fisher Scientific Labosi), servant de marqueur de mobilité et 40% (w/v) de saccharose (Fisher Scientific Labosi) dissout dans de l'eau.

Pour estimer la taille de nos échantillons après électrophorèse, un marqueur de DNA de taille de 1 kb (DNA Ladder, Promega), préparé selon les recommandations du fournisseur (1 volume de *blue/orange 6X Loading Dye* pour 5 volumes de solution *DNA Ladder*) est déposé dans un puit de manière à le faire migrer de la même manière que nos échantillons. Ce marqueur de taille contient différents fragments d'ADN de tailles connues qui serviront de référence pour estimer la taille de nos échantillons. La migration se fait en 30 min à 50 V.

La visualisation des bandes d'ADN est possible grâce au bromure d'éthidium incorporé dans le gel lors de sa préparation. C'est un agent mutagène qui s'intercale entre les acides nucléiques et fluoresce sous lumière UV à 254 nm. Après migration des échantillons, le gel est déposé sur un transilluminateur connecté à un micro-ordinateur. Les bandes d'ADN sont alors visibles et une photographie est prise.

2.4.4. Amplification par PCR

L'amplification de l'ADNr 16S est réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec un kit Invitrogen, en utilisant deux amorces: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Le mélange réactionnel contient, pour un volume final de 50 µL, les produits suivants:

- Tampon PCR 1X (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 9,0 à 25°C).
- MgCl₂: 25 mM 1,5 µL
- dNTP: 10 mM. 1 µL

- Amorces 27f: 50 μ M 1 μ L
- Amorces 1492r: 50 μ M 1 μ L
- Taq DNA polymerase: 1,25 U 0,2 μ L
- Extrait ADN: (200 ng) 1 μ L
- H₂O..... qsp 50 μ L

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur " Stratagene RoboCycler Gradient 96" selon le profil suivant:

- Une étape initiale de dénaturation à 98°C pendant 3 min, suivie de l'addition de Taq polymérase.
- 30 cycles d'amplification à 94°C pendant 1 min, 52°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min.
- Une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 min.

Les amplifiats obtenus sont visualisés sur gel d'agarose comme précédemment décrit.

2.4.5. Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage est effectué par la compagnie MilleGen (Toulouse, France) dans un séquenceur automatique. Les amorces sont les mêmes que celles utilisées lors de la PCR. Une fois la séquence déterminée, elle est comparée à celles des espèces de référence disponibles dans les banques génomiques de données en utilisant le "NCBI Blast" disponible sur Internet au niveau du site Web: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cette comparaison permettra d'évaluer les pourcentages de similarité entre les séquences des différentes espèces de référence.

2.4.6. Analyses phylogénétiques

Une fois les séquences déterminées, elles sont utilisées pour connaître la position phylogénétique de l'actinomycète.

Les séquences sont alignées grâce au logiciel « Clustal W ». Ce dernier permet de déterminer d'abord un arbre phylogénétique basé sur l'homologie entre les séquences et ensuite d'aligner successivement les séquences les plus proches en procédant de façon hiérarchique une paire à la fois. Les analyses phylogénétiques sont effectuées par les méthodes de calcul des matrices de distances d'évolution de Jukes et Cantor (1969) et en utilisant les méthodes de "Neighbor-Joining" (Saitou et Nei, 1987) pour les algorithmes de construction des topologies des arbres phylogénétiques. La méthode de validation statistique des liens phylogénétiques établis est le Bootstrap (Felsenstein, 1981).

III. ACTIVITES ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES SUR MILIEU SOLIDE

La mise en évidence des activités antibactériennes et antifongiques de 32 isolats parmi les 43 de la collection est effectuée par la méthode des cylindres d'agar préconisée par Patel et Brown (1969).

L'actinomycète est ensemencé en stries très serrées à la surface du milieu TSA contenant 10% de NaCl, coulé en boîte de Pétri. Après croissance à 30°C pendant 10 à 12 jours, des disques d'agar de 10 mm de diamètre contenant l'actinomycète, sont découpés avec un emporte-pièce et testés contre les bactéries, les levures et les champignons. Dans le cas des bactéries et des levures, les disques d'agar sont déposés à la surface du milieu gélose nutritive (contenant 7 g/L d'agar) préalablement ensemencé en nappe avec la souche-cible. Pour les champignons filamenteux, les disques de l'actinomycète sont déposés à 3 cm d'une colonie fongique centrale âgée de 2 jours et poussant sur ISP₂. Des disques de milieu non ensemencé par les actinomycètes sont utilisés en tant que témoin.

Les boîtes ensemencées sont incubées une nuit à 4°C pour permettre la diffusion des antibiotiques des disques d'agar tout en empêchant momentanément la croissance des microorganismes-cibles. Les boîtes sont retirées puis incubées à 30°C. La lecture est effectuée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques (le diamètre du disque n'étant pas pris en compte). La liste des germes-cibles est donnée précédemment au paragraphe I.2.

IV. PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE AH97

1. Souche d'actinomycète AH97

La souche d'actinomycète AH97 a été isolée à partir d'un échantillon de sol de Tamanrasset. Elle est conservée à 4°C par repiquages successifs sur milieu solide ISP₂ (Shirling et Gottlieb, 1966) (composition donnée en annexe 1). Elle a été retenue en raison de sa forte activité antibactérienne et antifongique et en raison de son appartenance à un genre très rare.

2. Souches de microorganismes-cibles

Plusieurs souches-cibles sont utilisées. Il s'agit de bactéries (Gram⁺ et Gram⁻), de champignons et de levures. Ces souches, dont la plupart ont été énoncées dans le paragraphe I.2, sont conservées au laboratoire sur milieu gélosé coulé en tubes à essai.

Les souches principales utilisées dans la majorité des expérimentations (cinétiques de production des antibiotiques, antibiographie, bioautographies, etc.) sont les suivantes:

Une bactérie à Gram positif: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et un champignon filamenteux: *Mucor ramannianus* (NRRL 1829). Ces microorganismes sont choisis en raison de leur grande sensibilité aux antibiotiques.

3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche AH97

3.1. Mise en évidence sur milieux solides

L'activité antimicrobienne de la souche AH97 est évaluée par la méthode des disques d'agar préconisée par Patel et Brown (1969) de la même manière que celle énoncée dans le paragraphe III, à l'exception du milieu TSA qui ne contient que 5% de NaCl.

3.2. Production des composés actifs en milieux liquides

3.2.1. Cinétique de production

La cinétique de production des composés actifs a été réalisée en vue de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées.

Des pré-cultures sont préparées à partir de cultures âgées de 10 jours et poussant sur milieu solide TSA à 5% de NaCl. Les spores sont récupérées et inoculées dans des tubes à essais contenant chacun 3 mL de milieu liquide. Les suspensions sont homogénéisées au vortex puis les tubes sont incubés à 30°C pendant 72 h. Des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL du même milieu liquide avec 5% de NaCl sontensemencées à raison de 5% (5 mL de culture pour 100 mL de milieu de culture neuf). Ces derniers sont incubés plusieurs jours à 30°C dans un shaker (250 rpm).

L'évolution de l'activité antimicrobienne, du pH et du poids sec du mycélium, est suivie quotidiennement.

- L'activité antimicrobienne est déterminée par la méthode des puits. Pour cela, le germe-cible (*Bacillus subtilis* ou *Mucor ramannianus*) estensemencé dans le milieu ISP₂ (contenant 12 g/l d'agar) maintenu en surfusion à 45°C, lequel est coulé par la suite dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre. Après solidification, des puits de 10 mm de diamètre sont réalisés dans le milieu (5 à 6 puits par boîte). Chaque puits reçoit 0,2 mL du filtrat de culture de l'actinomycète (prélevé quotidiennement). Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles. Elles sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 36 h. Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont alors mesurés.

- L'évolution du pH du milieu est mesurée grâce à un pH mètre et celle du poids sec, après lavage (à l'eau distillée) puis séchage du mycélium à 100°C durant 24 h.

3.2.2. Production de composés actifs en quantité appréciable

Afin d'obtenir une quantité appréciable de composés actifs nécessaires aux analyses chimiques (pour déterminer les structures), plusieurs fermentations ont été entreprises sur milieu TSB, dans les mêmes conditions que celles citées précédemment (voir paragraphes 3.2.1.). Au total, 15 L de culture sont obtenus, centrifugés puis extraits avec un solvant organique préalablement choisi (voir paragraphe 3.3.1.1.) selon le protocole de la figure 8.

3.3. Extraction des composés actifs et antibiographie

3.3.1. Extraction des composés actifs

L'extraction est faite à partir des filtrats de culture (au jour optimal de production) et à partir de la biomasse mycélienne.

3.3.1.1. Extraction à partir des filtrats de culture

Le filtrat de culture, débarrassé du mycélium par filtration, subit une extraction avec différents solvants non miscibles avec l'eau et de polarité différente (*n*-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol). Cette première expérience nous permettra ainsi de connaître le meilleur solvant d'extraction pour la suite de notre travail. Pour cela 100 mL de filtrat de culture sont extraits par le même volume de solvant dans une ampoule à décanter, à température ambiante. La phase organique est récupérée séparément puis évaporée sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est récupéré dans 1 mL de méthanol avant d'effectuer les tests d'antibiographie.

3.3.1.2. Extraction à partir du mycélium

Le mycélium récolté après filtration des cultures, est lavé plusieurs fois à l'eau distillée, égoutté, puis pesé. Un gramme de mycélium humide est extrait par 50 mL de méthanol, sous agitation durant 2 h à température ambiante.

Après filtration sur verre fritté n° 4, l'extrait méthanolique est évaporé à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide, puis récupéré dans 0,5 mL de méthanol et ce, afin de le tester par antibiographie.

3.3.2. Antibiographies et choix du solvant d'extraction

Les extraits obtenus à partir des filtrats de culture et du mycélium sont testés par antibiographie contre *Mucor ramannianus* et *Bacillus subtilis*.

Pour cela, nous avons utilisé la technique des disques de papier whatman de 6 mm de diamètre (Institut Pasteur, Paris). Ces disques sont imbibés par 50 μ L (pour les tests antibactériens) ou 80 μ L (pour les tests antifongiques) d'extrait organique et de la phase aqueuse résiduelle, puis séchés à 37°C durant 45 min avant d'être stérilisés sous UV à 254 nm durant 45 min et sous hotte axénique.

Les disques sont ensuite déposés stérilement à la surface du milieu ISP₂ (12 g/L d'agar), préalablement ensemencé par le germe-test. Les boîtes sont mises 2 h à 4°C (voir méthode des puits) puis incubées à 30°C. La lecture des résultats est effectuée après 24 à 36 h et consiste à déterminer le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de l'extrait organique et de la phase aqueuse.

3.4. Mise en évidence des composés actifs par bioautographie

3.4.1-Préparation des plaques de gel de silice

Les plaques de gel de silice sont préparées après mélange de 60 g de gel de silice G60 (Merck) dans 120 mL d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 500 mL. Après une forte et brève agitation (environ 30 s), la pâte est étalée de manière uniforme sur des plaques en verre propres (20 x 20 cm) en utilisant l'étaleur de Desaga réglé de manière à obtenir une couche de 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques sont séchées à 105°C pendant une nuit avant d'être utilisées.

3.4.2. Systèmes de solvants

Les systèmes de solvants retenus sont souvent utilisés pour la séparation des composés actifs (Zitouni, 2005):

- B.A.E. : *n*-butanol - acide acétique - eau (3/1/1; v/v/v).
- A.M.: acétate d'éthyle - méthanol (100/15; v/v).

3.4.3. Développement des plaques

- Après avoir déposé les échantillons (extraits mycéliens et des filtrats de culture) sur les plaques sous forme de spots (10 à 20 μ L par spot) à l'aide d'une micro-seringue, le développement est effectué dans des cuves saturées 2 h auparavant par les systèmes de solvants de migration.
- Après développement et au moment où le front du solvant a parcouru une distance d'environ 15 cm à partir du dépôt, les plaques sont retirées des cuves, séchées à

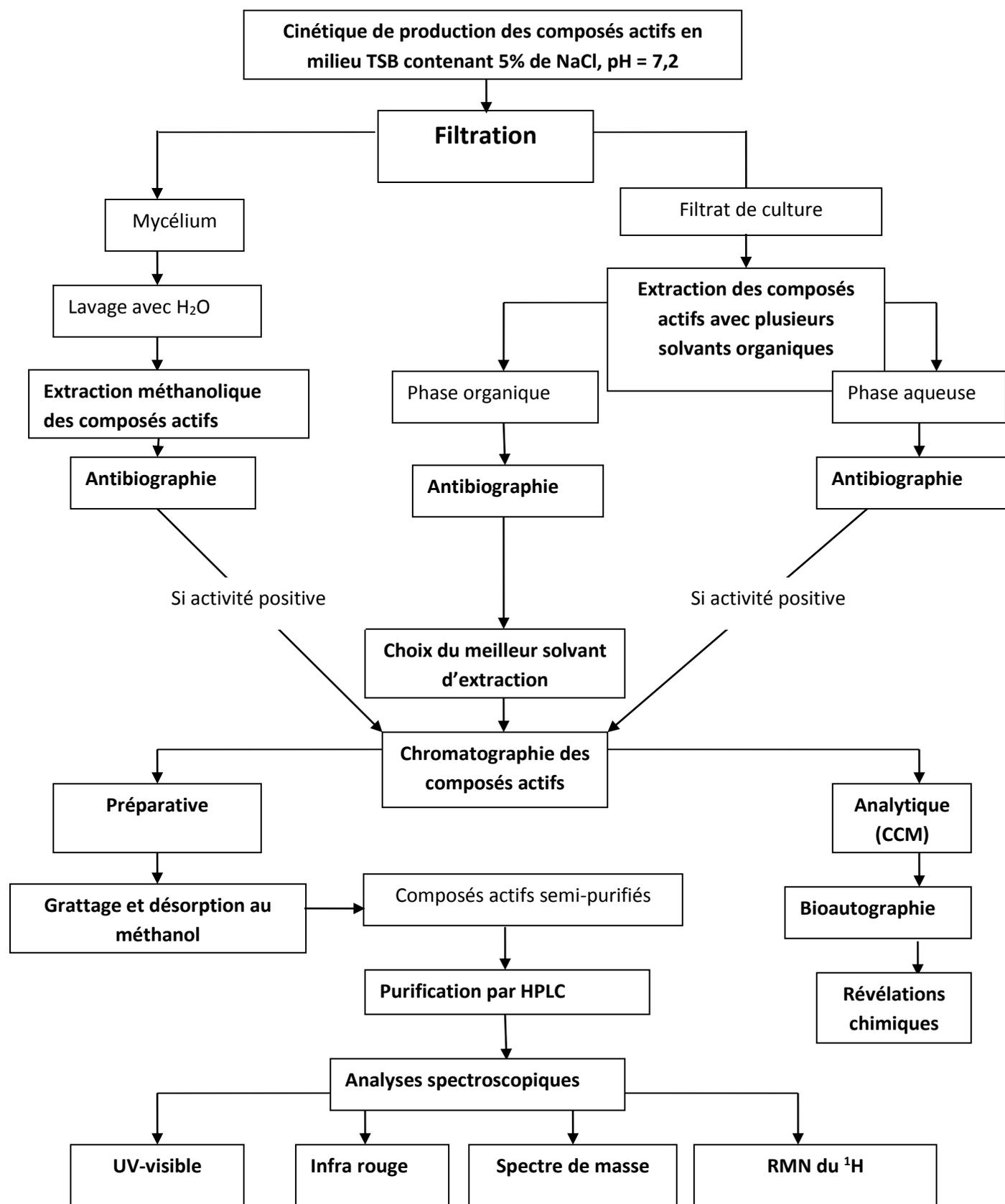


Figure 8. Protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques de l'isolat AH97.

température ambiante puis observées à l'œil nu et aux U.V. à 254 nm (absorption) et à 365 nm (fluorescence). Les tâches sont alors délimitées, ce qui permettra de situer les composés actifs entre eux et par rapport à ceux qui sont non actifs. Ceci facilitera ultérieurement le processus de purification.

3.4.4. Révélation microbiologiques ou bioautographie

La méthode utilisée pour la réalisation de la bioautographie est celle de Betina (1973). Elle consiste, d'une part, à détecter les tâches actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leur Rf (rapport frontal), et d'autre part, à choisir le meilleur système de solvant de migration permettant de séparer le mieux les composés actifs entre eux ou des autres composés non actifs.

Après migration, les plaques de gel de silice sont placées une nuit à l'étuve (37°C) pour évaporer les solvants. Chaque plaque est ensuite placée horizontalement sur des supports en verre dans une boîte en polyéthylène (22 x 24 cm) contenant à sa base un papier filtre imbibé d'eau stérile qui maintiendra une atmosphère humide et retardera ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est ensuite stérilisé sous UV à 254 nm durant 45 min. Parallèlement, 50 mL d'une gélose molle d'ISP₂ (à 7 g/L d'agar) en surfusion (45°C), sontensemencés avec 1 mL d'une suspension de germe-cibles. Le milieuensemencé est réparti avec une pipette stérile sur les plaques de gel de silice sous forme de film fin et uniforme. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des composés actifs puis incubées à 30°C. La lecture se fait après 24 à 36 h. Les zones d'inhibition des tâches actives sont alors observées et le Rf des zones actives est calculé selon la formule :

$$Rf = \frac{\text{Distance de migration entre dépôt et tâche active}}{\text{Distance de migration entre dépôt et front du solvant}}$$

3.5. Révélation chimiques des composés actifs

Après avoir choisi le meilleur solvant de migration et déterminé les Rf des composés actifs par bioautographie, d'autres plaques sont développées dans les mêmes conditions. Celles-ci vont servir à des révélations chimiques et ce, dans le but d'avoir un aperçu sur la nature chimique des antibiotiques.

La surface des plaques est alors pulvérisée par les révélateurs chimiques (Merck, 1975) suivants:

- Naphthorésorcinol-acide sulfurique: révélateur des glucides.
- Ninhydrine: révélateur des amines, des acides aminés, des osamines.

- Formaldéhyde-acide sulfurique: révélateur des aromatiques polycycliques.

Les tâches apparaissent soit à froid, soit après un chauffage de 5 à 10 min à 100°C. Les méthodes détaillées sont données en annexe 1.

3.6. Semi-purification des composés actifs

Les composés actifs sont semi-purifiés sur couches épaisses de gel de silice G60 (0,5 mm d'épaisseur) par chromatographie préparative et ce, dans le but d'avoir des quantités suffisantes pour les études ultérieures.

Dans ce cas, des plaques de 20 cm de côté sont préparées de la même manière que les plaques fines. Environ 250 à 400 µL de chaque extrait concentré sont déposés en une bande mince et continue sur les plaques de gel de silice. Celles-ci sont ensuite développées dans l'éluant sélectionné au cours de l'étude bioautographique, afin de localiser avec précision les bandes actives (une bioautographie est toujours réalisée en parallèle). Une fois la migration terminée, la silice correspondant aux zones actives est alors grattée. Les composés actifs sont désorbés de la silice dans 100 à 200 mL de méthanol sous agitation permanente, pendant 30 min, à température ambiante. La silice est par la suite éliminée après filtration sur verre fritté n° 4 (sous vide). Le filtrat méthanolique limpide est recueilli et son activité est contrôlée par antibiographie. Il est évaporé à sec puis conservé à - 30°C dans un congélateur pour pouvoir par la suite procéder à la purification finale des composés actifs par HPLC.

3.7. Purification finale des composés actifs par HPLC

La purification finale est réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'appareillage, ainsi que les conditions expérimentales sont donnés ci-après.

3.7.1. Appareillage

L'appareil utilisé pour la purification est de type Waters. Il comprend un contrôleur modèle 600, une pompe modèle 600 à 4 voies, un détecteur Dual λ Absorption 2487, un enregistreur "Linear-intégrateur" modèle 740 Data Module et un injecteur modèle 590. Deux types de colonnes et pré-colonnes ont été utilisés en fonction du type de molécules à purifier.

- Une précolonne C18 VP 50/10 (50 mm de long \times 10 mm de \varnothing interne) et une colonne semi-préparative C18 (250 mm de long \times 7,8 mm de \varnothing interne, UP5 ODS) pour séparer les molécules hydrophobes ou peu hydrophiles.

- Une précolonne C18 Nucléodur 100-5 et une colonne semi-préparative Nucléodur C18 pyramide (250 mm de long x 10 mm de Ø interne, Machery Nagel) pour séparer les molécules hydrophiles.

3.7.2. Conditions expérimentales

La phase mobile est un gradient continu d'un mélange méthanol-eau ultra pure précédemment dégazé pendant 15 min avec de l'hélium.

Pour séparer les molécules hydrophobes des molécules hydrophiles, nous avons utilisé le programme suivant: 0% d'eau en isocratique pendant 6 min et un gradient linéaire continu de 0 à 100% de méthanol/eau pendant 30 min puis 100% de méthanol pendant 10 min (sur colonne C18 UP5 ODS).

Pour séparer les molécules hydrophobes entre elles, un gradient linéaire "méthanol-eau" de 80 à 100% (30 min) a été utilisé (sur colonne C18 UP5 ODS).

Pour séparer les molécules hydrophiles entre elles, nous avons utilisé des conditions isocratiques en utilisant de l'eau ultra-pure, sans méthanol, durant 30 min (colonne C18 nucléodur).

Dans les 3 cas, le débit est de 2mL/min et la détection se fait à 220 nm.

La purification totale des substances actives est obtenue après 3 ré-injections successives.

Ces gradients ont été choisis en raison de leur meilleur pouvoir de séparation des substances actives (choix fait après plusieurs essais préliminaires).

L'extrait semi-purifié par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice est solubilisé dans un minimum de méthanol ou d'eau ultra pure, ultrafiltré (filtre à 0,20 µm de porosité), puis injecté dans l'HPLC (250 à 500 µL par injection).

Les différentes fractions obtenues sont récupérées séparément puis concentrées à sec sous air comprimé. Elles sont testées par antibiographie afin de vérifier l'activité. La purification finale est obtenue après plusieurs ré-injections et l'activité des éluats correspondant à chaque pic est vérifiée par antibiographie contre *M. ramannianus* et *B. subtilis*.

3.8. Etudes spectroscopiques des antibiotiques

3.8.1. Spectroscopie UV-visible

L'étude spectroscopique dans l'UV-visible permet d'avoir un aperçu général sur le produit obtenu. A partir des spectres obtenus, elle nous renseigne sur la classe à laquelle appartient l'antibiotique en comparaison avec les antibiotiques connus et identifiés. Elle permet également de connaître le degré de saturation des molécules (présence ou non de doubles liaisons).

Le spectre UV-visible est déterminé en premier lieu sur les extraits butanoliques bruts, pour noter la présence ou non de polyènes, lesquels présentent 3 pics caractéristiques (voir partie bibliographique) puis sur les composés actifs après purification par HPLC.

L'extrait est solubilisé dans du méthanol puis analysé à l'aide d'un spectrophotomètre SHIMADZU UV 260, précédemment étalonné avec du méthanol.

3.8.2. Spectroscopie Infra-Rouge

Cette méthode permet la détermination de certains groupes fonctionnels (amines, hydroxyles, carboxyles), d'aromatiques, de méthyles, d'esters, de cétones etc., qui se caractérisent par l'apparition de bandes d'absorption dans l'Infra-Rouge (Williams et Fleming, 1989).

La méthode utilisée est celle de la pastille de bromure de potassium (KBr): un milligramme de composé actif parfaitement sec est broyé dans un mortier d'agate avec 100 mg de bromure de potassium (KBr). Ce dernier est utilisé car il ne présente aucune bande d'absorption dans l'Infra-Rouge. Le mélange homogène est placé dans un dispositif spécial permettant la réalisation d'une pastille circulaire translucide sous haute pression pendant 4 à 5 min. La pastille est placée dans un spectrophotomètre à Infra-Rouge (SHIMADZU IR 470) où elle est traversée par le flux lumineux entre 400 et 4000 cm^{-1} .

3.8.3. Spectrométrie de masse

Les masses des composés actifs purs sont déterminées avec un spectromètre LCQ ion-trap (Finnigan MAT, San Jose, CA).

La technique utilisée est celle de "Nano-Electrospray Ionisation" (Nano-ESI-IT-MS) qui repose sur la détermination des masses moléculaires des échantillons avec un spectromètre LCQ ion-trap (Finnigan MAT, San Jose, CA). Elle permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des éléments présents dans l'échantillon analysé. Les éléments chargés qui en résultent sont soumis à l'action d'un champ magnétique. Le spectre de masse représente sous forme graphique l'abondance des ions de fragmentation.

L'analyse est réalisée en mode positif et en mode négatif. Le programme d'analyse utilisé est Xcalibur 1.2 de ThermoQuest (San Jose, USA).

3.8.4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton

La spectroscopie RMN ^1H a été utilisée pour la caractérisation des composés. Les échantillons (entre 1 et 3 mg) ont été solubilisés dans 600 μL de l'eau deutérié ou méthanol deutérié (CD_3OD). Les spectres RMN ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker AC-400, avec les signaux de solvants comme références (400 MHz pour la RMN ^1H).

Partie III

RESULTATS ET DISCUSSION

I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES HALOPHILES

Pour cette étude, les isolats d'actinomycètes halophiles ont fait l'objet d'une description morphologique préliminaire, dans le but de les classer dans des groupes morphologiques homogènes. Chaque groupe comprenant des isolats semblables morphologiquement. Ainsi, les résultats de l'étude macromorphologique, résumés dans le tableau 8, montrent que les 43 isolats se répartissent en 4 groupes:

- **Groupe 1:** c'est le groupe majoritaire. Il est constitué de 35 isolats dont 34 produisent un mycélium aérien (MA) abondant, se fragmentant de manière anarchique (sans sporophore distinct) en chaînes de spores souvent en "zig-zag" et un mycélium du substrat (MS) plus ou moins fragmenté. Un isolat produit des traces de MA et un MS qui se fragmente abondamment. L'ensemble des isolats possède une bonne croissance sur les milieux TSA et CMA, une croissance modérée sur le milieu ISP2 et une croissance faible sur le milieu ISP4. Les isolats ne produisent pas de pigments solubles à l'exception d'un seul qui sécrète un pigment rougeâtre.
- **Groupe 2:** il regroupe 5 isolats à MA blanc. Les hyphes produisent des sporophores portant des chaînes de spores droites ou spiralées. Le nombre de spores par chaîne est supérieur à 50. Le MS ne se fragmente pas. Les 5 isolats présentent une bonne croissance sur les milieux ISP2, TSA et CMA et une croissance modérée sur le milieu amidon-nitrate agar. Aucun pigment soluble n'est sécrété.
- **Groupe 3:** il est représenté par deux isolats ayant un MA bleu-gris et un MS non fragmenté. Le MA produit des spores sessiles formées individuellement sur les hyphes aériens. Un pigment brun est sécrété sur le milieu amidon-nitrate agar. Une bonne croissance est notée sur les milieux ISP4, TSA et amidon-nitrate agar.
- **Groupe 4:** il comprend un seul isolat à MA bleu-verdâtre à bleu-grisâtre et un MS qui tend à la fragmentation. Un pigment soluble brun à noir est sécrété. Des chaînes de spores sont produites sur le MA de manière anarchique (sans sporophores). La croissance est bonne sur le milieu TSA et absente sur les milieux ISP4, CMA et amidon-nitrate agar.

Chacun de ces quatre groupes semble correspondre à un genre particulier. Ceci sera confirmé par la suite.

Tableau 8. Caractéristiques culturelles des 43 isolats d'actinomycètes halophiles.

		Groupes et nombre d'isolats par groupe					
			G1		G2	G3	G4
Milieux de culture		33	1(AH25)	1(AH26)	5	2	1
Extrait de levure-extrait de malt agar (ISP2)	Croissance	++	++	++	+++	++	++
	Production de MA	++	++	-	+++	++	++
	Fragmentation de MS	++	++	++	-	-	+
	Production de PS	-	+	-	-	-	-
Amidon-sels inorganiques agar (ISP4)	Croissance	+	+	+	-	+++	-
	Production de MA	+	+	-	-	+++	-
	Fragmentation de MS	+	+	+	-	-	-
	Production de PS	-	-	-	-	-	-
Bacto tryptone-soja agar (TSA)	Croissance	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Production de MA	+++	+++	+	+++	+++	+++
	Fragmentation de MS	+++	+++	++	-	-	+++
	Production de PS	-	+++	-	-	++	+++
Milieu complexe agar (CMA)	Croissance	+++	+++	+++	+++	++	-
	Production de MA	+++	+++	++	+++	++	-
	Fragmentation de MS	+++	+++	++	-	-	-
	Production de PS	-	+++	-	-	-	-
Amidon-nitrate agar	Croissance	-	-	-	+++	+++	-
	Production de MA	-	-	-	+++	+++	-
	Fragmentation de MS	-	-	-	-	-	-
	Production de PS	-	-	-	-	+++	-

MA: mycélium aérien. MS: mycélium du substrat. PS: pigment soluble. +++: abondant; ++: modéré; +: faible; -: inexistant. Tous les milieux contiennent 10% de NaCl, sauf pour l'isolat du groupe G4 (5%).

CHAPITRE I

**ETUDE TAXONOMIQUE ET MISE EN EVIDENCE
DES ACTIVITES ANTIBIOTIQUES DES ISOLATS
D'ACTINOMYCETES HALOPHILES
DU GROUPE G1**

ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS DU GROUPE G1

1. Résultats

1.1. Détermination du genre

L'identification du genre est basée sur des critères morphologiques et chimiques. Les 35 isolats faisant partie du groupe G1 ont fait l'objet de cette étude.

1.1.1 Étude morphologique

1.1.1.1. Caractéristiques culturelles

Les caractéristiques culturelles des 35 isolats sont rapportées dans le tableau 9. L'ensemble des isolats présente en général les mêmes caractéristiques culturelles entre eux. Ils possèdent une bonne croissance sur milieux CMA et TSA, une croissance modérée sur milieu ISP2 et une faible croissance sur milieu ISP4 (après 12 jours de culture à 30°C).

Le mycélium aérien est mieux produit et abondant (de couleur blanchâtre à blanc-beige) sur les milieux TSA et CMA pour l'ensemble des isolats, sauf pour AH26 dont le MA est microscopique. Le mycélium du substrat est non coloré ou de couleur jaune clair pour tous les isolats, à l'exception de AH26 et AH25. Les pigments solubles ne sont pas sécrétés, sauf pour AH25 qui produit un pigment rougeâtre diffusible sur milieux ISP2, CMA et TSA. La sporulation est abondante sur TSA et CMA, modérée sur ISP2 et faible sur ISP4.

1.1.1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les 35 isolats présentent un mycélium aérien abondant, se fragmentant de manière anarchique (sans sporophore distinct) en chaînes de spores souvent en "zig-zag", et un mycélium du substrat plus ou moins fragmenté. La fragmentation est particulièrement abondante chez l'isolat AH26.

1.1.2. Analyse chimique des constituants cellulaires

L'étude chimique des constituants cellulaires des isolats de ce groupe a révélé que: L'ensemble des isolats présentent un chimiotype IIIC (Lechevalier et Lechevalier, 1970b) caractérisé par la présence de l'isomère DL de l'acide diaminopimélique (*meso* DAP) dans la paroi cellulaire, mais pas de glycine. Dans l'hydrolysate cellulaire, du glucose et du ribose sont détectés; les sucres caractéristiques comme l'arabinose, le madurose, le xylose ou le rhamnose sont absents.

Tableau 9. Caractéristiques culturelles des 35 isolats d'actinomycètes halophiles du groupe G1.

Milieux +10% de NaCl	Nombre d'isolats	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Pigment soluble
Extrait de levure-extrait de malt agar (ISP2)	33	++	++ Blanc	Jaune clair	-
	1 (AH25)	++	++ Blanc	Rouge-brun	-
	1 (AH26)	++	-	Orange	-
Amidon-sels inorganiques agar (ISP4)	33	+	+ Blanc	Jaune clair	-
	1 (AH25)	+	+ Blanc	Blanc	-
	1 (AH26)	+	-	Orange-rose	-
Bacto tryptone-soja agar (TSA)	33	+++	+++ Blanc-beige	Jaune clair	-
	1 (AH25)	+++	+++ Blanc-beige	Rouge-brun	+++ rougeâtre
	1(AH26)	+++	+ Blanc	Orange-rose	-
Milieu complexe agar (CMA)	33	+++	+++ Blanc	Jaune clair	-
	1 (AH25)	+++	+++ Blanc	Rouge-brun	+++ rougeâtre
	1 (AH26)	+++	++ Blanc	Orange-rose	-
Amidon-nitrate agar	33	-	-	-	-
	1 (AH25)	-	-	-	-
	1 (AH26)	-	-	-	-

Croissance ou production des pigments solubles: +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; - = nulle.

Ainsi, les isolats ont des parois cellulaires de type III et des sucres de type C (Lechevalier et Lechevalier, 1970b). Les phospholipides membranaires sont de type PIII, caractérisés par la présence de la phosphatidylcholine (Lechevalier *et al.*, 1977).

Les principaux acides gras cellulaires (tableau 10), déterminés pour les isolats AH0, AH4, AH12, AH19, AH25, AH26, AH38, AH44, AH46, AH62 et AH67, sont de types iso-C_{15:0} (1,1 à 4,8% sauf AH26, 18,9%), antéiso-C_{15:0} (4,8 à 8,4% sauf AH25, 0,00%), C_{15:0} (0 à 1,0%), iso-C_{16:0} (19,0 à 36,9%), antéiso-C_{17:0} (24,2% à 42,2%), C_{17:0} Me_{Cis-9, 10} (0 à 4,4%), C_{18:1} C_{Cis-9} (6,1 à 12,0% sauf AH26, 0,3%) et C_{18:0} (0,8 à 6,9%).

Le type cellulaire en acides gras correspond au type 3d (dominance d'acides gras à chaînes ramifiées en C₁₆ et C₁₇ iso/antéiso et d'acides gras à chaînes ramifiées et méthylées). Ce type est caractéristique du genre *Nocardiosis* (Kroppenstedt et Eventushenko, 2006).

1.1.3. Identification du genre

Sur la base des caractéristiques morphologiques (présence de mycélium aérien abondant se fragmentant de manière anarchique, sans sporophore distinct, en chaînes de spores souvent en “zig-zag”, et un mycélium du substrat plus ou moins fragmenté) et chimiques (paroi de type IIIC, phospholipides de type PIII et acides gras de type 3d), les isolats sont rattachés au genre *Nocardiosis*.

1.2. Détermination des espèces

La détermination des espèces est basée sur les caractéristiques physiologiques et moléculaires.

1.2.1. Etude physiologique des isolats de *Nocardiosis*

Les résultats sont présentés dans les tableaux 11 à 16. Les 35 isolats de *Nocardiosis* présentent beaucoup de similitudes entre eux, mais aussi plusieurs différences; en effet:

Tous les isolats peuvent croître sur les milieux de culture dont la concentration en NaCl varie de 7 à 15%, et presque aucun ne croît à 0%. Certains d'entre eux peuvent supporter jusqu'à 20% (ou plus) avec un optimum de croissance à 10% (tableau 11). Les isolats peuvent être définis comme des microorganismes halophiles modérés.

Tous les isolats se développent à 30 et à 37°C, et seuls 7 isolats sont capables de croître à 42°C. L'intervalle de pH permettant la croissance de ces isolats se situe entre 7,0 et 9,0 (pH optimum: 7). Aucune croissance n'est observée à pH 5 (tableau 12).

Tableau 10. Composition en acide gras des isolats d'actinomycètes halophiles du groupe G1.

Acide gras (%)*	Isolats								
	AH0	AH4	AH12	AH19	AH25	AH26	AH44	AH62	AH67
3 OH C _{12:0}	1,83	2,31	1,13	1,44	2,44	0,17	1,66	1,91	1,85
C _{14:0}	0,71	0,30	0,00	0,19	0,40	0,00	0,15	0,25	0,22
Iso- C _{15:0}	1,80	4,81	1,14	2,30	1,69	18,95	1,29	2,61	2,49
Antéiso C _{15:0}	5,81	8,42	6,48	11,19	0,00	7,23	4,82	6,85	7,38
C _{15:0}	0,33	0,31	0,00	0,26	0,29	1,03	0,17	0,21	0,00
Iso-C _{16:0}	28,12	26,12	21,90	19,03	36,91	20,48	31,50	31,68	30,59
C _{16:1} Cis-9	1,72	5,07	0,00	1,31	1,60	0,26	1,15	2,04	1,68
C _{16:0}	5,18	2,62	3,27	0,00	3,59	1,03	2,16	2,12	2,32
Iso-C _{17:0}	3,65	8,73	5,38	5,73	4,07	5,21	4,50	7,65	7,04
Antéiso-C _{17:}	27,33	24,18	42,16	36,51	25,37	38,09	30,31	30,95	27,96
C _{17:0} Me Cis-9	1,31	0,00	0,00	1,21	0,85	4,41	0,45	0,33	0,00
C _{18:2}	5,44	1,82	5,44	4,02	7,15	2,09	8,21	3,81	5,16
C _{18:1} Cis-9	10,17	12,05	6,38	8,41	8,69	0,26	6,94	6,10	6,95
C _{18:0}	6,60	3,25	6,73	8,41	6,94	0,78	6,70	3,50	6,35

*Le pourcentage est donné par rapport au total des acides gras.

Le type cellulaire en acides gras correspond au type 3d (Kroppenstedt et Eventushenko, 2006). Ce type est caractérisé par la présence d'acides gras à chaînes ramifiées en C16 et C17 iso/antéiso et d'acides gras à chaînes ramifiées et méthylées.

Tableau 11. Croissance des isolats de *Nocardiosis* en présence de différentes concentrations de NaCl.

Isolats AH	Concentration en NaCl (%) sur milieu TSA					
	0	7	10	15	20	25
0	-	+++	+++	+++	+++	+
1	-	+++	+++	+++	+++	-
2	-	+++	+++	++	++	-
3	-	+	++	+++	++	-
4	-	++	++	++	-	-
12	+	++	+++	+	-	-
15	-	++	++	++	-	-
17	-	+	++	++	-	-
18	-	++	+++	+++	-	-
19	-	-	++	++	-	-
22	-	++	+++	+++	-	-
24	-	+++	+++	+++	++	-
25	-	+++	++	++	++	+
26	-	+++	++	++	-	-
33	-	+++	+++	++	+/-	-
36	-	+++	++	++	-	-
37	-	+++	++	++	-	-
38	-	+/-	+++	+++	-	+
44	-	++	+++	++	-	-
46	-	++	+++	+++	+++	+/-
47	-	+++	++	++	-	-
48	-	++	+++	++	-	-
49	-	++	+++	++	-	-
50	-	+++	++	++	-	-
52	-	++	+++	++	++	+/-
54	-	++	+++	++	++	-
56	-	+++	+++	++	+	-
57	-	++	+++	++	-	-
59	+	++	+++	++	++	-
60	-	++	++	++	++	-
62	-	+++	+++	++	++	-
63	-	+++	+++	++	-	-
64	-	++	++	++	-	-
65	-	-	+++	++	-	-
67	-	+++	+++	+++	-	-
%	5,7	97,2	100,0	100,0	40,0	14,3

Croissance: +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; +/- = très faible; - = nulle.

%: pourcentage des isolats présentant un test positif.

Tableau 12. Croissance des isolats de *Nocardiosis* à différents pH et températures.

Isolats AH	pH 5	pH 9	37°C	42°C
0	-	++	+++	-
1	-	++	+++	-
2	-	++	+++	-
3	-	++	+++	-
4	-	+	+++	-
12	-	++	+++	+++
15	-	+++	+++	-
17	-	+++	+++	-
18	-	+++	+++	-
19	-	+++	+++	-
22	-	+++	+++	-
24	-	++	+++	+
25	-	-	+++	-
26	-	++	+++	+++
33	-	++	+++	-
36	-	++	+++	+++
37	-	++	+++	-
38	-	+++	+++	-
44	-	+++	+++	-
46	-	++	+++	-
47	-	+++	+++	-
48	-	+++	+++	-
49	-	+++	+++	-
50	-	++	+++	-
52	-	++	+++	-
54	-	++	+++	-
56	-	++	+++	-
57	-	-	+++	-
59	-	++	+++	-
60	-	++	+++	+++
62	-	++	+++	+++
63	-	++	+++	+++
64	-	++	+++	++
65	-	+	+++	-
67	-	+++	+++	-
%	0	94,3	100,0	22,9

Croissance: +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; - = nulle.

Remarque: la croissance à pH= 7 et à 30°C est bonne (+++) pour tous les isolats.

Milieu utilisé: TSA. %: pourcentage des isolats présentant un test positif.

L'ensemble isolats utilise l'adénine, l'hypoxanthine, la gélatine et la xanthine (sauf AH26) et aucun ne dégrade la testostérone. Plus de 50% des isolats sont capables de se développer sur milieu contenant de l'alanine et de la proline comme unique source de carbone et d'azote et incapable de pousser en présence de la sérine (tableau 13).

La capacité d'environ deux tiers des isolats à utiliser des acides organiques tels que l'acétate, le butyrate, le citrate, le propionate, le pyruvate et le succinate a été observée. Aucun isolat ne dégrade le benzoate, l'oxalate et le tartrate, à l'exception de AH64 et parfois AH62 (tableau 14).

L'arabinose est le monosaccharide le plus assimilé par l'ensemble des isolats étudiés. D'après les résultats présentés dans le tableau 15, les isolats sont souvent utilisateurs de sucres (mono et disaccharides, soit 20 sucres au total) comme source unique de carbone et d'énergie. Par contre, la majorité des isolats sont incapables d'assimiler le raffinose (trisaccharide). L'amidon est utilisé par la totalité des isolats à l'exception d'un seul (AH26).

La majorité des isolats produit la nitrate réductase et peut croître en présence de lysozyme.

Tous les isolats sont sensibles au chloramphénicol ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), l'érythromycine (15 UI), la novobiocine ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), la rifampicine ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), la streptomycine (10 UI) (sauf 10 isolats) et la vancomycine ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) (tableau 16).

Tableau 13. Dégradation de divers composés organiques et d'acides aminés par les isolats d'actinomycètes halophiles du genre *Nocardiopsis*.

Isolats AH	Adénine	Amidon	Arbutine	Caséine	Esculine	Gélatine	Guanine	Testostérone	Tween 80	Tyrosine	Xanthine	Hypoxanthine	Alanine	Proline	Sérine
0	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
1	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
4	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
12	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
17	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
18	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
19	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
22	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
24	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-
25	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
26	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
33	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
36	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
37	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
38	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
44	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
46	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
47	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
48	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
49	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
50	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
52	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
54	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
56	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
57	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
59	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
60	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
62	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
63	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
64	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
65	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
67	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
%	100	97,2	65,6	74,3	68,6	100	2,8	0	85,7	68,6	97,2	100	51,4	65,7	0

+, test positif; -, test négatif. NB: toutes les expériences ont été réalisées en double.

%: pourcentage des isolats présentant un test positif.

Tableau 14. Dégradation des acides organiques par les isolats d'actinomycètes halophiles du genre *Nocardiopsis*.

Isolats AH	Acétate	Benzoate	Butyrate	Citrate	Oxalate	Propionate	Pyruvate	Succinate	Tartrate
0	+	-	+	+	-	+	+	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	+	-	+	-	+	-
15	-	-	-	-	-	-	-	+	-
17	+	-	+	+	-	+	+	+	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	-	+	+	-	+	+	+	-
22	+	-	-	-	-	-	-	+	-
24	+	-	+	+	-	+	+	+	-
25	+	-	+	+	-	+	+	+	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	+	-	+	+	-	+	+	+	-
37	+	-	+	+	-	+	+	+	-
38	+	-	+	+	-	+	+	+	-
44	+	-	+	+	-	+	+	+	-
46	+	-	+	+	-	+	+	+	-
47	+	-	+	+	-	+	+	+	-
48	+	-	+	+	-	+	+	+	-
49	+	-	+	+	-	+	+	+	-
50	+	-	+	+	-	+	+	+	-
52	+	-	+	+	-	+	+	+	-
54	+	-	+	+	-	-	+	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	+	-	+	+	-	+	+	+	-
62	+	-	+	+	+	+	+	+	+
63	+	-	+	+	-	+	+	+	-
64	+	+	+	+	+	+	+	+	-
65	+	-	+	+	-	+	+	+	-
67	+	-	+	+	-	+	+	+	-
%	68,6	2,9	68,6	68,6	5,7	65,7	65,7	71,4	2,9

, test positif; -, test négatif. NB: toutes les expériences ont été réalisées en double.

%; pourcentage des isolats présentant un test positif.

Tableau 15. Dégradation des sucres et dérivés par les isolats d'actinomycètes halophiles du genre *Nocardioopsis*.

Isolats AH	Adonitol	Arabinose	Cellobiose	Fructose	Galactose	Glucose	Inositol	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Mélibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicine	Saccharose	Sorbitol	Tréhalose	Xylose
0	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
2	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
3	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
12	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
17	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
18	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
22	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
24	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
25	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
26	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
33	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
36	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
37	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
38	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
46	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
50	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
52	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
54	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
56	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
60	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
62	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
63	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
64	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
67	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
%	71,4	91,4	88,6	62,9	77,1	85,7	42,9	68,6	60,0	77,1	65,7	42,9	11,4	62,9	82,9	48,6	51,4	34,3	51,4	80,0

Tableau 16. Croissance en présence de lysozyme, production de nitrate réductase et résistance aux antibiotiques des isolats d'actinomycètes halophiles du genre *Nocardiopsis*.

Isolats AH	Croissance en présence de lysozyme	Production de Nitrate réductase	Résistance aux antibiotiques					
			Rifampicine	Chloramphénicol	Erythromycine	Novobiocine	Streptomycine	Vancomycine
0	+	+	-	-	-	-	-	-
1	+	+	-	-	-	-	+	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-
3	-	+	-	-	-	-	+	-
4	+	+	-	-	-	-	+	-
12	+	+	-	-	-	-	+	-
15	-	+	-	-	-	-	-	-
17	-	+	-	-	-	-	+	-
18	+	+	-	-	-	-	-	-
22	+	+	-	-	-	-	+	-
19	+	+	-	-	-	-	-	-
24	-	+	-	-	-	-	+	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	+	-	-	-	-	-	-
33	-	+	-	-	-	-	-	-
36	+	+	-	-	-	-	-	-
37	-	+	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	+	-	-	-	-	-	-
46	-	+	-	-	-	-	+	-
47	+	+	-	-	-	-	-	-
48	+	+	-	-	-	-	-	-
49	+	+	-	-	-	-	-	-
50	-	+	-	-	-	-	-	-
52	+	+	-	-	-	-	-	-
54	-	+	-	-	-	-	-	-
56	+	+	-	-	-	-	-	-
57	-	+	-	-	-	-	+	-
59	+	+	-	-	+	-	-	-
60	+	+	-	-	-	-	-	-
62	+	+	-	-	-	-	-	-
63	+	+	-	-	-	-	-	-
64	-	+	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	+	-	-	-	-	-	-
%	51,4	88,6	0	0	2,86	0	28,6	0

+, test positif; -, test négatif. NB: Toutes les expériences ont été réalisées en double.
%: pourcentage des isolats présentant un test positif.

1.2.2. Etude moléculaire

1.2.2.1. Séquençage de l'ADNr 16S

Les séquences de l'ADNr 16S de 24 isolats représentatifs de ce groupe ont été déposées au niveau de la GenBank sous les numéros d'accès figurant au tableau 17.

La comparaison des séquences de l'ADNr 16S des 24 isolats avec celles des espèces connues les plus proches de *Nocardiopsis* a donné des pourcentages de similarité allant de 97,4% à 99,8% (tableau 17). Ce résultat confirme donc l'appartenance de ces isolats au genre *Nocardiopsis*.

La figure 9 montre l'arbre phylogénétique indiquant la position taxonomique de nos isolats par rapport aux autres espèces du même genre.

1.2.3. Identification des espèces

L'arbre phylogénétique montre que nos isolats se répartissent en 5 groupes ou clades et un isolat non groupé:

1. Le clade 1 comporte 12 isolats et la souche-type de l'espèce *Nocardiopsis xinjiangensis*.
2. Le clade 2 comporte 8 isolats et les deux souches-types des espèces de *Nocardiopsis kunsanensis* et *N. litoralis*.
3. Le clade 3 comporte un isolat et la souche-type de l'espèce *Nocardiopsis salina*.
4. Le clade 4 comporte un isolat et la souche-type de l'espèce *Nocardiopsis terrae*.
5. Le clade 5 comporte un isolat et la souche-type de l'espèce *Nocardiopsis halotolerans*.
6. L'isolat AH24 ne s'est regroupé avec aucune autre souche.

2. Discussion

Les 24 isolats ont été caractérisés tout d'abord par leur morphologie et leurs constituants cellulaires. Ils produisent un mycélium aérien blanc, abondant à rare, avec de longs filaments aériens, modérément ramifiés et flexueux, et montrent une formation en "zig-zag" typique avant de se fragmenter en de longues chaînes de spores en bâtonnets non mobiles. Les isolats présentent une paroi cellulaire de type IIC (Lechevalier et Lechevalier, 1970b) avec présence de l'isomère DL de l'acide diaminopimélique et absence de sucres caractéristiques tels que l'arabinose, le madurose, le rhamnose et le xylose. Le phospholipide diagnostique détecté (phosphatidylcholine) correspond au type PIII (Lechevalier *et al.*, 1977) et les acides gras cellulaires correspondent au type 3d (Kroppenstedt et Eventushenko, 2006).

Ces caractéristiques morphologiques et chimiques sont ceux du genre *Nocardiopsis* auquel ont été rattachés les isolats.

Tableau 17. Pourcentages de similarités des isolats d'actinomycètes du groupe G1 avec les espèces les plus proches de *Nocardioopsis*.

	Isolats	Numéros d'accèsion à la GenBank	% de similarité avec les espèces les plus proches de <i>Nocardioopsis</i>
Clade 1	AH4	JF777510	99,6% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH15	JF777512	99,7% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH17	JF777513	99,7% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH25	JF777516	99,6% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH33	JF777518	99,7% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH36	JF777519	99,8% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH44	JF777522	99,6% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH46	JF777523	98,4% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH47	JF777524	99,7% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH57	JF777527	99,8% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH62	JF777528	99,6% <i>N. xinjiangensis</i>
	AH65	JF777530	99,7% <i>N. xinjiangensis</i>
Clade 2	AH0	JF777508	99,5% <i>N. kunsanensis</i> , 99,7% <i>N. litoralis</i>
	AH12	JF777511	98,5% <i>N. kunsanensis</i> 98,7% <i>N. litoralis</i>
	AH38	JF777520	98,9% <i>N. kunsanensis</i> 99,2% <i>N. litoralis</i>
	AH63	JF777529	98,2% <i>N. kunsanensis</i> 98,4% <i>N. litoralis</i>
	AH64	NS	97,4% <i>N. kunsanensis</i> 97,6% <i>N. litoralis</i>
	AH67	JF777532	99,5% <i>N. kunsanensis</i> 99,7% <i>N. litoralis</i>
	AH1	JF777509	99,4% <i>N. kunsanensis</i> 99,3% <i>N. litoralis</i>
	AH 52	JF777525	99,0% <i>N. kunsanensis</i> 99,6% <i>N. litoralis</i>
Clade 3	AH26	JF777516	98,8% <i>N. salina</i>
Clade 4	AH37	JF777508	99,4% <i>N. terrea</i>
Clade 5	AH19	JF777514	99,3% <i>N. halotolerans</i>
Isolat non groupé	AH24	JF777515	98,9% <i>N. xinjiangensis</i> 98,8% <i>N. kunsanensis</i> 98,7% <i>N. litoralis</i>

NS: séquence non soumise à la GenBank.

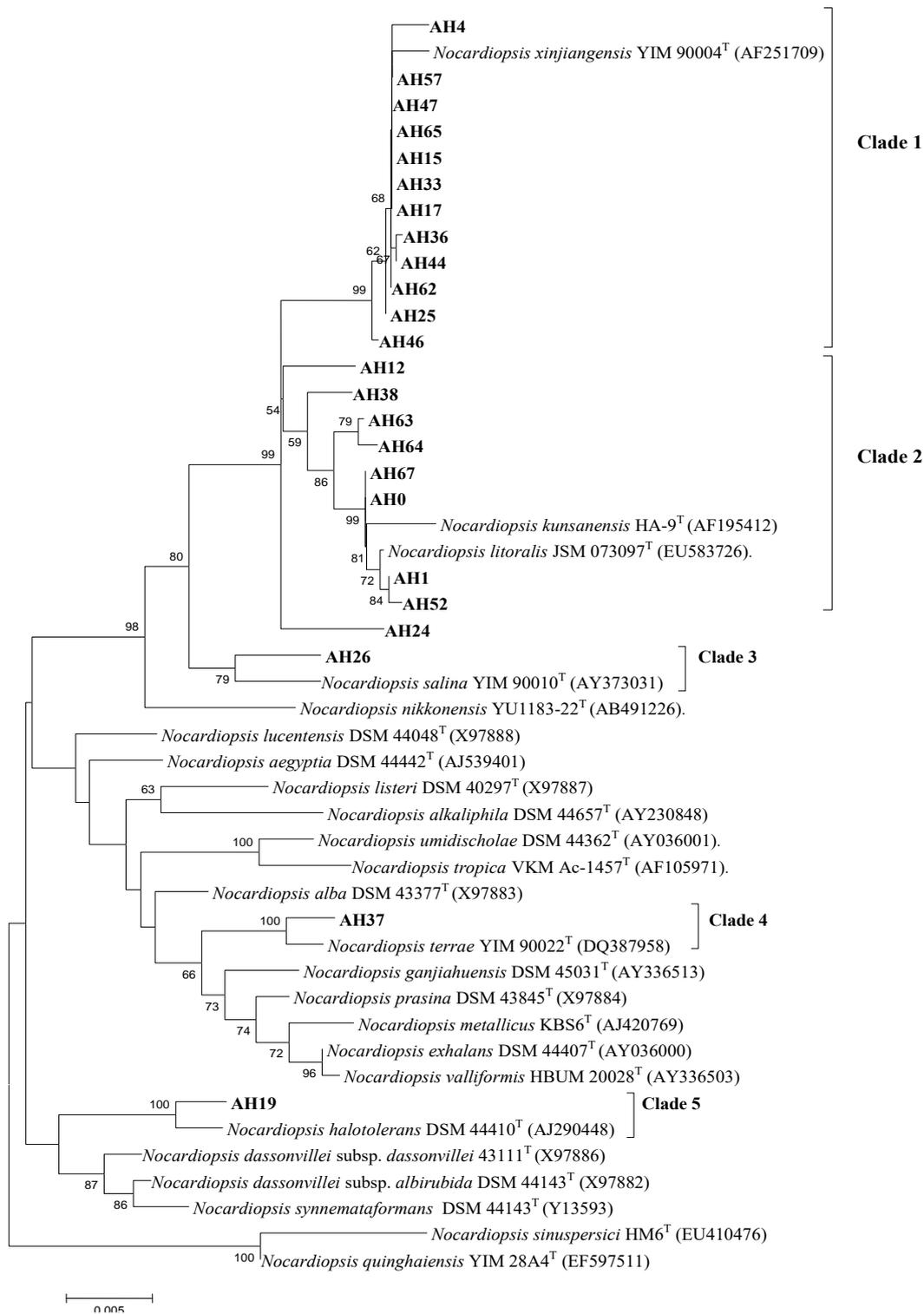


Figure 9. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les 24 isolats d'actinomycètes du groupe G1 et les souches-types des espèces du genre *Nocardioopsis*.

les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les pourcentages du support « bootstrap » effectués par la méthode du « neighbor-joining ». Ne sont donnés que les pourcentages supérieurs à 50%. La barre indique 0.005 substitution par position de nucléotide. Les numéros

Les isolats du clade 1 sauf AH46 sont phylogénétiquement très proches de *N. xinjiangensis* (99,6 à 99,8% de similarité).

Certains isolats du clade 2 comme AH0, AH67, AH1 et AH52 sont très proches de *N. kunsanensis* et *N. litoralis*. Cependant, même si le taux de similitude avec les espèces proches est élevé, il n'est pas nécessairement significatif sachant que d'autres espèces de *Nocardiopsis* ont des taux similaires. Exemples: *N. litoralis* et *N. kunsanensis* (99,6 %), *N. metallicus* et *N. exhalans*. (99,5 %), *N. metallicus* et *N. parasina*. (99,4 %), *N. sinuspersici* et *N. quinghaiensis* (99,3%) etc.

Ainsi, les isolats qui ont une grande probabilité d'être une nouvelle espèce sont:

- AH46 (98,4% avec *N. xinjiangensis*).
- AH12 (98,7% avec *N. litoralis*).
- AH38 (99,2% avec *N. litoralis*).
- AH63 (98,4% avec *N. litoralis*).
- AH64 (97,6% avec *N. litoralis*).
- AH24 (98,9% avec *N. xinjiangensis*).
- AH26 (98,8% avec *N. salina*).
- AH37 (99,4% avec *N. terrea*).
- AH19 (99,3% avec *N. halotolerans*).

La différence physiologique très nette entre nos isolats et les espèces les plus proches augmente encore la probabilité d'être de nouvelles espèces.

Stackebrandt et Ebers (2006) ont suggéré que des valeurs comprises entre 97 et 99% du seuil similarité du gène de séquence de l'ADNr 16S différencient les espèces entre elles, à condition que ces données soient confirmées par de nettes différences phénotypiques. Cependant, actuellement, dans le cas où le pourcentage de similitude est supérieur à 97%, une hybridation ADN-ADN est nécessaire avec les espèces les plus proches (*N. xinjiangensis* YIM 90004^T, *N. kunsanensis* KCTC 9831^T, *N. litoralis*, *N. salina* YIM 90010^T, *N. terrae* 90022^T YIM^T et *N. halotolerans* DSM 44410^T) pour clarifier la position taxonomique de nos isolats, à savoir, leur appartenance à ces espèces ou à de nouvelles espèces.

La comparaison des caractéristiques physiologiques des 24 isolats avec celles des espèces de référence de *Nocardiopsis* a été effectuée.

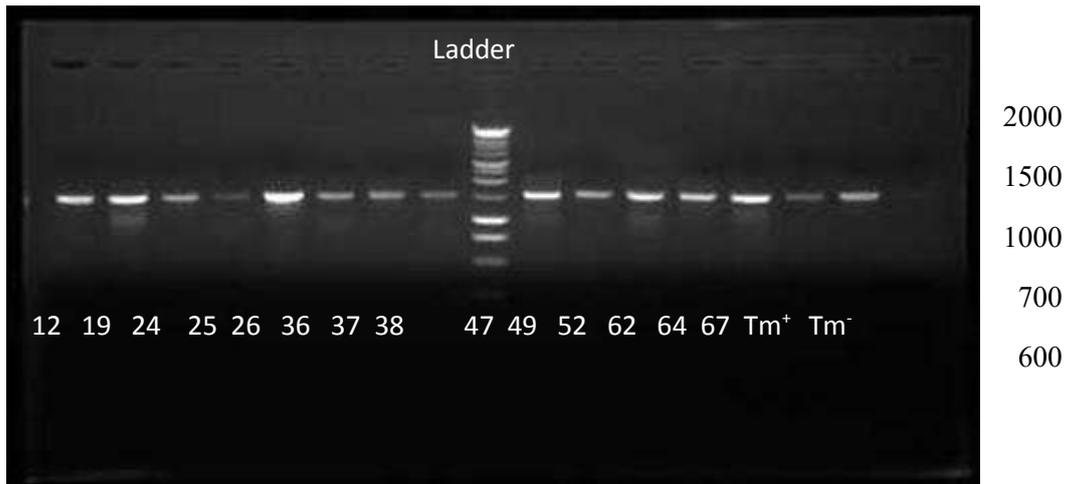


Figure Résultats de l'amplification de l'ADN ribosomique 16S des différents isolats du groupe G1.
Tm⁺ : Tubuline, Tm⁻ : Eau

- **Isolats du clade 1**

Le premier clade comporte 12 isolats d'actinomycètes halophiles et la souche-type de l'espèce *N. xinjiangensis* avec un niveau de similarité compris entre 98,4% et 99,8% (tableau 17).

Les 12 isolats sont morphologiquement similaires à *N. xinjiangensis* 90004T YIM, à savoir, un mycélium aérien blanc, un mycélium du substrat jaune clair et pas de production de pigment soluble, et ce à l'exception de l'isolat AH25 ayant un mycélium du substrat rouge et un pigment soluble rougeâtre.

Du point de vue physiologique (tableau 18), les 12 isolats se ressemblent entre eux avec cependant quelques différences.

Les isolats AH15, AH17, AH33, AH47, AH57 et AH65 sont identiques entre eux. AH4 diffère des autres isolats du même clade par la non dégradation du fructose, du galactose et de la proline. AH36 et AH44 se distinguent par la non dégradation du mélibiose et de la caséine. AH62 diffère par la non dégradation du xylose et la croissance à 20% de NaCl. AH25 diffère par la non dégradation du ribose et la croissance à 20% de NaCl. AH46 diffère par la non dégradation de la caséine, du ribose et la croissance à 20% de NaCl.

Les 12 isolats diffèrent de *N. xinjiangensis* par l'utilisation de l'amidon, de la gélatine et du glucose, la non-utilisation de la sérine, la production de nitrate réductase et l'absence de pigments mélanoïdes.

D'autres tests physiologiques distinctifs de *N. xinjiangensis* sont notés. Le nombre de ces tests (sur un total de 18) varie entre 5 et 11 selon l'isolat considéré.

En outre, les hydrolysats cellulaires de *N. xinjiangensis* contiennent le xylose, l'arabinose et le galactose en plus de glucose et de ribose, (Li *et al.*, 2003a), contrairement à nos isolats où l'on note l'absence de xylose, d'arabinose et de galactose.

- **Isolats du clade 2**

Le second clade comporte 8 isolats d'actinomycètes halophiles et les souches-types des espèces *Nocardiopsis litoralis* et *N. kunsanensis* avec un niveau de similitude (ADNr 16S) se situant entre 97,6% et 99,7%, et 97,4% et 99,5% respectivement.

Du point de vue physiologique (tableau 18), les 8 isolats (AH1, AH52, AH0, AH67, AH63, AH64, AH38 et AH12) diffèrent entre eux par 1 à 5 caractères. C'est le cas de AH1 (diffère par la non dégradation du fructose, du galactose et de la sérine), AH52 (non dégradation de la caséine), AH0 et AH67 (non utilisation du cellobiose et du fructose), AH38 (non dégradation de la caséine et du ribose, dégradation du raffinose et absence de nitrate réductase) et AH12 (non dégradation du xylose, du galactose et de l'acétate de sodium, et croissance à 0% de NaCl).

Les 8 isolats diffèrent majoritairement de la souche-type de:

- ✓ *N. litoralis* (7 à 10 différences), par l'utilisation de l'amidon, de la caséine, du cellobiose, du fructose, du galactose, du ribose et de la proline et par la production de nitrate réductase, et la décarboxylation de l'acétate de sodium.
- ✓ *N. kunsanensis* (6 à 9 différences), par la liquéfaction de la gélatine, l'utilisation du cellobiose, du galactose, du ribose, du xylose, de la proline et de l'acétate de sodium, la non dégradation du mélibiose, et la production de nitrate réductase.

- **Isolat AH24 (non groupé)**

Cet isolat est éloigné de ceux du clade 2 et diffère de ces derniers par la non dégradation du cellobiose, du fructose, du ribose et de l'alanine et par sa croissance à 20% de NaCl. Les espèces proches sont *N. kunsanensis* et *N. litoralis* avec un niveau de similitude (ADNr 16S) de 98,8% et 98,7% respectivement. L'isolat AH24 diffère en plus de *N. kunsanensis* par la dégradation de la gélatine, du galactose, du xylose, de la proline et de l'acétate de sodium, par la non utilisation du fructose, du mélibiose et de l'alanine et par la production de nitrate réductase. Il diffère de *N. litoralis* par l'utilisation de l'amidon, de la caséine, du galactose, de la proline et de l'acétate de sodium, la non utilisation de l'alanine, la production de nitrate réductase et la croissance à 20% de NaCl.

Tableau 18. Caractéristiques physiologiques distinctives des isolats de *Nocardiosis* du premier et du deuxième clades, et de l'isolat AH24, en comparaison avec les souches-types des espèces de *Nocardiosis xinjiangensis* YIM 90004^T (*N. x.*), *N. litoralis* JSM 073097^T (*N. l.*) et *N. kunsanensis* KTC98 31^T (*N. k.*).

Caractéristiques	Isolats du 1 ^{er} clade						<i>N. x.</i>	Isolats du deuxième clade						AH24	<i>N. l.</i>	<i>N. k.</i>
	AH15, AH17, AH33, AH47, AH57, AH65	AH4	AH36 AH44	AH62	AH25	AH46		AH1	AH52	AH0 AH67	AH63 AH64	AH38	AH12			
Dégradation de:																
Amidon	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Caséine	+	+	-	+	+	-	ND	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Gélatine	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Utilisation comme seule source de carbone:																
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fructose	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
Galactose	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélibiose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Xylose	+	-	V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Utilisation comme seule source d'azote et de carbone:																
Alanine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Proline	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sérine	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de nitrate																
Réductase	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Décarboxylation de l'acétate de sodium	V	-	V	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Production de pigments																
Mélanoïdes	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à (w/v):																
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
20% NaCl	-	-	-	+	+	+	+	+	+	V	-	-	-	+	-	+

+, test positif; -, test négatif; ND, test non déterminé. V, variable selon les souches. Toutes les expériences ont été réalisées en double.

- **Isolats du clade 3**

Le troisième clade regroupe l'isolat AH26 avec *Nocardiopsis salina* YIM 90010^T. Leur niveau de similarité (ADNr 16S) est de 98,9%. *N. salina* produit un mycélium aérien blanc, utilise le ribose et le fructose comme source de carbone, ainsi que la sérine comme source d'azote mais n'utilise pas le xylose (Li *et al.* 2004), et ce, contrairement à AH26.

- **Isolats du clade 4**

Le quatrième clade comporte l'isolat AH37 et la souche-type *N. terrae* YIM 90022^T, l'espèce la plus proche ayant un niveau de similarité (ADNr 16S) de 99,4%.

Physiologiquement, l'isolat AH37 diffère de *Nocardiopsis terrae* (Chen *et al.*, 2010) par la couleur du mycélium aérien, l'incapacité de produire un pigment brun foncé, la capacité à utiliser l'esculine, la gélatine, le Tween 80, l'arabinose, le galactose, le lactose, le maltose, le mélibiose, le mannitol, l'acétate et la proline, l'absence de croissance à 3-5% de NaCl, l'optimum de croissance en présence de 10% de NaCl et le pH optimal de croissance qui de 7 (tableau 19).

- **Isolats du clade 5**

Le cinquième clade comprend l'isolat AH19 avec *N. halotolerans* DSM 44410^T, liés entre eux phylogénétiquement par un pourcentage de similarité de 99,3%. L'isolat AH19 est halophile, et non halotolérant comme la souche-type de *N. halotolerans*

N. halotolerans, produit un mycélium aérien blanc à jaune-gris, utilise le galactose, le mélibiose et le mannose comme source de carbone, n'utilise pas l'arabinose, l'adonitol et le xylose et présente une bonne croissance en absence de NaCl (Al Zarban *et al.*, 2002a), et ce, contrairement à AH19.

3. Conclusion

Les résultats des études morphologique, chimique et moléculaire ont permis d'identifier les 24 isolats au genre *Nocardiopsis*. La comparaison de leurs caractéristiques culturelles et physiologiques avec celles des espèces de *Nocardiopsis*, ainsi que l'analyse phylogénique suggèrent fortement la présence de nouvelles espèces. Une hybridation ADN-ADN avec les espèces proches est nécessaire pour confirmer leur originalité

Tableau 19. Caractéristiques distinctives entre la souche AH37 et l'espèce la plus proche, *Nocardiopsis terrae* YIM 90022^T (clade 4).

Caractéristiques	AH37	<i>Nocardiopsis terrae</i> YIM 90022 ^T
Couleur du mycélium aérien	Beige	Blanc
Pigment diffusible sur ISP2	Non produit	Brun foncé
Utilisation de:		
Esculine	+	-
Gélatine	+	-
Tween 80	+	-
Utilisation comme seule source de carbone (1%, w/v):		
Arabinose	+	-
Galactose	+	-
Lactose	+	-
Mannitol	+	-
Maltose	+	-
Mélibiose	+	-
Acétate	+	-
Utilisation comme seule source de carbone et d'azote:		
L proline	+	-
Croissance en présence de NaCl % (w/v):		
0	-	-
3	-	+++
5	-	+++
7	+++	+
10	++	+
15	++	+
20	-	-
Croissance en présence de NaCl en % w/v (optimum)	7-15 (7)	1-15 (3-5)
Gamme de pH (optimum)	7-9 (7)	6,0-10,5 (8.5)
Gamme de température (optimum)	18-37 (30)	10-45 (30)

+, test positif; -, test négatif. Toutes les expériences ont été réalisées en double.

II.- ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES ISOLATS DE *NOCARDIOPSIS*

1. Résultats

Le tableau 20 montre le criblage préliminaire des activités antimicrobiennes des 24 isolats de du genre *Nocardiosis*, évalué par la méthode des disques d'agar, contre 19 germes-cibles: six bactéries à Gram négatif, six bactéries à Gram positif, deux levures et cinq champignons filamenteux.

1.1-Activités des 12 isolats du clade 1

Les isolats de ce clade montrent une activité très forte (20-30 mm) contre *Rhizopus nigricans* (7 isolats actifs), une activité modérée à forte (12-24 mm) contre *Pseudomonas syringae* (12 isolats actifs), *Salmonella enterica* (11 isolats actifs) et *Serratia marcescens* (7 isolats actifs) et une activité modérée (10-17 mm) contre *Agrobacterium tumefaciens* (9 isolats actifs), *Kluyveromyces lactis* (8 isolats actifs), *Klebsiella pneumoniae* (4 isolats actifs) et *Staphylococcus aureus* (3 isolats actifs).

1.2-Activités des 8 isolats du clade 2

Les isolats de ce clade montrent une activité modérée à forte (11-25 mm) contre *Pseudomonas syringae* (8 isolats actifs), *Salmonella enterica* (8 isolats actifs) et *Serratia marcescens* (4 isolats actifs), une activité modérée (11-19 mm) contre *Agrobacterium tumefaciens* (3 isolats actifs), *Kluyveromyces lactis* (4 isolats actifs), *Klebsiella pneumoniae* (1 isolat actif), et une activité très forte (20-28 mm) mais pour un seul isolat, contre *Staphylococcus aureus* et *Rhizopus nigricans*.

1.3- Activités des autres isolats

- Activité de l'isolat AH24 (isolat non groupé)

Cet isolat a montré une activité forte (20-25 mm) contre *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Kluyveromyces lactis* et *Rhizopus nigricans*, une activité modérée (11-12 mm) contre *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Staphylococcus aureus* et aucune activité contre *Klebsiella pneumoniae*.

Tableau 20. Activité antimicrobienne (diamètres des zones inhibition en mm) des isolats d'actinomycètes halophiles du genre *Nocardiopsis* contre divers microorganismes.

Organismes-cibles	Isolats du 1 ^{er} clade												Isolats du 2 ^{eme} clade								Isolat non groupé	Isolats des clades		
	AH15	AH17	AH33	AH47	AH57	AH65	AH4	AH36	AH44	AH62	AH25	AH46	AH1	AH52	AH0	AH67	AH63	AH64	AH38	AH12	AH24	3	4	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	15	-	-	-	-	-	12	-	-	-	11	-	-	-	-	-	20	-	-	12	-	-	13
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15	13	14	10	-	12	11	-	14	13	11	-	19	-	11	-	-	-	-	11	11	11	-	13
<i>Klebsiella pneumonia</i>	15	-	-	-	-	-	13	-	14	-	-	14	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
<i>Pseudomonas syringae</i>	24	12	12	21	20	12	24	20	18	16	13	20	20	12	22	12	12	18	18	11	12	18	-	23
<i>Salmonella enterica</i>	20	18	16	20	19	18	12	20	15	-	20	21	14	22	25	15	17	13	18	15	25	20	-	20
<i>Serratia marcescens</i>	15	20	-	-	12	-	12	-	15	18	11	-	-	-	18	25	11	15	-	-	20	-	-	20
<i>Kluyveromyces lactis</i>	13	11	11	-	-	11	12	30	16	17	-	-	-	-	-	12	15	-	14	13	20	15	-	11
<i>Rhizopus nigricans</i>	-	20	30	-	20	25	-	30	-	30	-	20	-	28	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-

* l'activité a été réalisée en utilisant la méthode des cylindres d'agar. Le diamètre du cylindre (5 mm) n'est pas inclus dans les diamètres des zones d'inhibition. -, activité non détectée. Par ailleurs, l'activité des isolats de *Nocardiopsis* est nulle contre *Bacillus coagulans*, *B. subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus carbonarius*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC4226 et *Mucor ramannianus* NRRL 1829. Des disques de milieu non ensemencés par les actinomycètes sont utilisés en tant que témoin.

-Activité de l'isolat AH26 du clade 3

Cet isolat a montré une activité forte (18-20 mm) contre *Pseudomonas syringae* et *Salmonella enterica*, et modérée (11-15 mm) contre *Agrobacterium tumefaciens* et *Kluyveromyces lactis*. Aucune activité n'est détectée contre *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* et *Rhizopus nigricans*.

-Activité de l'isolat AH37 du clade 4

Cet isolat n'a montré aucune activité contre l'ensemble des germes-cibles testés.

-Activité de l'isolat AH19 du clade 5

Cet isolat a montré une activité forte (20-23 mm) contre *Pseudomonas syringae*, *Salmonella enterica* et *Serratia marcescens*, et modérée (11-13 mm) contre *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Kluyveromyces lactis*. Aucune activité n'est détectée contre *Rhizopus nigricans*.

Cependant, pour les 24 isolats de *Nocardiopsis*, aucune activité n'a été observée contre *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* et les champignons filamenteux (*Botrytis cinerea* et diverses espèces d'*Aspergillus*) autres que *Rhizopus nigricans*.

2. Discussion

Le pouvoir antimicrobien des 24 isolats de *Nocardiopsis* des sols sahariens a été effectué par la méthode des disques d'agar contre 19 germes-cibles: six bactéries à Gram négatif, six bactéries à Gram positif, deux levures et cinq champignons.

Les isolats ont montré des activités dirigées surtout contre les bactéries à Gram négatif en effet:

- 100% des isolats des clades 1 (sauf AH37), 2, 3 et 5, ainsi que l'isolat AH24, ont montré une activité contre *Pseudomonas syringae*.
- 75% des isolats du clade 1 et 37,5% du clade 2, ainsi que AH24, ont montré une activité contre *Agrobacterium tumefaciens*.
- 50% des isolats du clade 1 et 58% du clade 2, ainsi que AH24 et l'isolat du clade 5, ont montré une activité contre *Serratia marcescens*.
- 33% des isolats du clade 1 et 12,5% du clade 2, ainsi que l'isolat du clade 5, ont montré une activité contre *Klebsiella pneumoniae*.

En revanche, l'activité contre les bactéries à Gram positif est nulle ou obtenue avec un faible pourcentage comparé aux autres germes cibles:

- 25% des isolats du clade 1, 12,5% du clade 2, AH24 et les isolats des clades 3 et 5 ont montré une activité contre *Staphylococcus aureus*.
- Aucun isolat n'est actif contre *Bacillus subtilis*, *B. coagulans* et *Enterococcus faecalis*.

L'activité antifongique est limitée uniquement à une levure et un champignon filamenteux.

- 66,7% des isolats du clade 1, 50% du clade 2, AH24 et l'isolat du clade 5 sont actifs contre *Kluyveromyces lactis*.
- 58,3% des isolats du clade 1, 11,5% du clade 2, AH24 et l'isolat du clade 5 ont montré une activité contre *Rhizopus nigricans*.

Il est connu que les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries à Gram positif (Prescott *et al.*, 2003).

De ces résultats, on peut déduire que les isolats d'actinomycètes halophiles étudiés dans le cas présent produisent des molécules agissant surtout contre les bactéries à Gram négatif, ce qui s'avère être intéressant.

Les isolats les plus intéressants sont ceux qui sont actifs contre *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas syringae* et aussi contre *Staphylococcus aureus*.

Des travaux antérieurs effectués au sein de notre laboratoire sur les *Nocardiopsis* non halophiles mais tolérants jusqu'à 10 et 13% de NaCl ont montré la production d'antibiotiques actifs contre les bactéries à Gram positif et les champignons mais très rarement contre les bactéries à Gram négatif (Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2005). Les *Nocardiopsis* sont connus pour être des producteurs d'une grande variété d'antimétabolites: herbicides, insecticides, antifongiques, antibactériens (phénazine, iodinine, 3-tréhalosamine, thiolactomycine, etc.) et antitumoraux (Pendolmycin) (Kroppenstedt et Evtushenko, 2006; Genilloud *et al.*, 2011).

Très peu d'études sur la production d'antibiotiques par les *Nocardiopsis* halophiles ont été effectuées dans le monde.

Les résultats obtenus avec la souche de *Nocardiopsis* sp. VITSVK5 halotolérante (2% de NaCl) d'origine marine ont montré une activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et une activité antifongique (Vimal *et al.*, 2009).

Une étude effectuée sur des *Nocardiopsis* isolés à partir de sédiments a montré la production d'un antibiotique de nature thiopeptidique nommé "TP-1161", produit par les souches TFS 806 et TFS 91, et actif contre les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus* 585, *S. epidermidis* 533, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* 568 et *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, mais pas contre les bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Engelhardt *et al.*, 2010).

3. Conclusion

On peut conclure que l'activité des 23 isolats de *Nocardiopsis* étudiés dans le cas présent est beaucoup plus antibactérienne qu'antifongique.

L'activité antibactérienne est dirigée essentiellement contre les bactéries à Gram négatif pour la majorité des isolats, ce qui est intéressant au vu de la résistance connue de ce type de bactéries à de nombreux antibiotiques. Les fortes activités sont obtenues contre *Salmonella enterica* et *Pseudomonas syringae*, ce qui est intéressant, vu la pathogénicité et la toxicité de *S. enterica* pour l'homme et la phytopathogénicité de *P. syringae*.

L'activité contre les bactéries à Gram-positif est rare et moins importante; elle est dirigée exclusivement contre *Staphylococcus aureus*.

CHAPITRE II

**ETUDE TAXONOMIQUE ET MISE EN EVIDENCE
DES ACTIVITES ANTIBIOTIQUES DES ISOLATS
D'ACTINOMYCETES HALOPHILES
DU GROUPE G2**

I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS DU GROUPE G2

1. Résultats

1.1. Détermination du genre

1.1.1 Étude morphologique

1.1.1.1. Caractéristiques culturelles

Les caractéristiques culturelles des isolats AH21, AH27, AH28, AH30 et AH40 appartenant au groupe G2 sont rapportées dans le tableau 21.

Les isolats présentent les mêmes caractéristiques culturelles entre eux. Ils possèdent une bonne croissance sur le milieu ISP2 et une croissance moyenne sur les milieux TSA et ISP4 (après 12 jours à 30°C). Aucune croissance n'est notée sur les milieux CMA et amidon-nitrate agar. Le mycélium aérien est mieux produit sur ISP2 et ISP4 (abondant); il a une couleur blanche à jaunâtre. Le mycélium du substrat est non coloré ou de couleur jaune clair pour tous les isolats. Les pigments solubles ne sont pas sécrétés. La sporulation est abondante sur ISP2, modérée sur TSA et absente sur les autres milieux.

1.1.1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les cinq isolats produisent un mycélium du substrat non sporulant et non fragmenté. Le mycélium aérien est constitué de filaments ramifiés qui se terminent par des chaînes de spores (dont le nombre est supérieur à 50 spores par chaîne) portées par des sporophores. La morphologie des chaînes est de type S (spiralées = spires lâches de 2 à 4 tours/spire) pour les cinq isolats.

1.1.2. Étude chimiotaaxonomique

L'étude chimiotaaxonomique des isolats AH21, AH27, AH28, AH30 et AH40 a montré la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique avec de la glycine dans sa paroi cellulaire. L'analyse des hydrolysats cellulaires a permis de noter l'absence de sucres caractéristiques (pas d'arabinose, xylose, madurose et rhamnose) et présence de ribose, de glucose et de galactose dans l'hydrolysate cellulaire. Ceci correspond au chimiotype IC tel que défini par Lechevalier et Lechevalier (1970b). Les phospholipides sont de type PII, caractérisés par la présence de la phosphatidyléthanolamine (PE) (Lechevalier *et al.*, 1977).

Tableau 21. Caractéristiques culturales des isolats d'actinomycètes halophiles du groupe G2.

Milieux +10% de NaCl	Croissance	Sporulation	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments solubles
Extrait de levure-extrait de malt agar (ISP2)	+++	+++	Blanc	Jaune pâle	-
Amidon-sels inorganiques agar (ISP4)	++	++	Jaunâtre	Blanc jaunâtre	-
Bacto tryptone-soja agar (TSA)	++	++	Jaunâtre	Jaune pâle	-
Milieu Complexe agar (CMA)	-	-	-	-	-
Amidon-nitrate agar	-	-	-	-	-

Croissance: + + +, abondante; + +, modérée; -, absente.

Les isolats du groupe 2 (AH21, AH27, AH28, AH30 et AH40) présentent les mêmes caractéristiques culturales et micromorphologiques.

1.1.3. Identification du genre

Sur la base des caractères morphologiques (présence de mycélium aérien, présence de chaînes de spores portées par un sporophore) et chimiques (chimiotype IC, phospholipides de type PII), les isolats sont rattachés au genre *Streptomyces*.

1.2. Détermination de l'espèce

1.2.1. Étude physiologique

Le tableau 22 illustre les résultats des tests physiologiques des isolats AH21, AH27, AH28, AH30 et AH40. La croissance optimale de ces cinq isolats est observée à 30°C, à pH 7 et en présence de NaCl à une concentration de 7 à 10%. Les isolats sont capables de croître à 20% de NaCl, à pH 9 et à 37°C, mais incapables de croître à 0 et 5% de NaCl, à pH 5 et à 42°C.

Les isolats utilisent l'adénine, l'arbutine (sauf AH21), la caséine (sauf AH28, AH30), l'esculine, la gélatine, l'hypoxanthine, l'amidon, le Tween 80, la tyrosine (sauf AH27), la xanthine, l'adonitol (sauf AH28, AH30), l'arabinose (sauf AH40), le cellobiose, le fructose, le galactose, le glucose, le lactose (sauf AH27 et AH30), le maltose (sauf AH30), le mannitol (sauf AH27 et AH 40), le mannose (sauf AH21), le mélibiose (sauf AH27), le raffinose (sauf AH27 et AH30), le rhamnose, le ribose, le saccharose, la salicine (sauf AH 40), le tréhalose (sauf AH21), le xylose, l'alanine, la proline et le citrate (sauf AH28, AH30) mais ne dégradent pas la guanine (sauf AH27), la testostérone (sauf AH30), l'inositol, le sorbitol (sauf AH28), la sérine (sauf AH28 et AH30), l'acétate (sauf AH 27), le benzoate, le butyrate (sauf AH21), l'oxalate, le propionate (sauf AH27), le pyruvate (sauf AH21 et AH27), le succinate (sauf AH27) et le tartrate (sauf AH30). Ils réduisent les nitrates, sont résistants au lysozyme (0,005%) et à la vancomycine (30 µg mL⁻¹) et sont sensibles à la streptomycine (10 UI), au chloramphénicol (30 µg mL⁻¹), à l'érythromycine (15 UI), à la novobiocine (5 µg mL⁻¹) et à la rifampicine (5 µg mL⁻¹).

1.2.2. Etude moléculaire

Le séquençage de l'ADNr 16S n'a pas été effectué pour les cinq isolats de *Streptomyces*.

Tableau 22. Caractéristiques physiologiques des isolats du genre *Streptomyces*.

Tests	Isolats AH					Tests	Isolats AH				
	21	27	28	30	40		21	27	28	30	40
Dégradation de composés organiques:						Utilisation des sources d'azote et de carbone					
Adénine	+	+	+	+	+	Alanine	+	+	+	+	+
Arbutine	-	+	+	+	+	Proline	+	+	+	+	+
Caséine	+	+	-	-	+	Sérine	-	-	+	+	-
Esculine	+	+	+	+	+	Décarboxylation des sels de sodium:					
Gélatine	+	+	+	+	+	Acétate	-	+	-	-	-
Guanine	-	+	-	-	-	Benzoate	-	-	-	-	-
Hypoxanthine	+	+	+	+	+	Butyrate	+	-	-	-	-
Amidon	+	+	+	+	+	Citrate	+	+	-	-	+
Testostérone	-	-	-	-	-	Oxalate	-	-	-	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	Propionate	-	+	-	-	-
Tyrosine	+	-	+	+	+	Pyruvate	+	+	-	-	-
Xanthine	+	+	+	+	+	Succinate	-	+	-	-	-
Utilisation des sources de carbone:						Croissance en présence de NaCl (%):					
Adonitol	+	-	+	-	+	0	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	-	5	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	7	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	10	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	20	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	Sensibilité au:					
Inositol	-	-	-	-	-	Lysozyme (0,005% w/v)	R	R	R	R	R
Lactose	+	-	+	-	+	Chloramphénicol (30 µg mL ⁻¹)	S	S	S	S	S
Maltose	+	+	+	-	+	Erythromycine (15 UI)	S	S	S	S	S
Mannitol	+	-	+	+	-	Novobiocine (5 µg mL ⁻¹)	S	S	S	S	S
Mannose	-	+	+	+	+	Streptomycine (10 UI)	S	S	S	S	S
Mélibiose	+	-	+	+	+	Vancomycine (30 µg mL ⁻¹)	R	R	R	R	R
Raffinose	+	-	+	-	+	Croissance à:					
Rhamnose	+	+	+	+	+	pH 5	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	pH 7 et 9	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	-	42 C	-	-	-	-	-
Salicine	+	+	+	+	-						
Sorbitol	-	-	+	-	-						
Tréhalose	-	+	+	+	+						
Xylose	+	+	+	+	+						
Production de pigments mélanoides											

+, test positif; -, test négatif; S, sensibilité; R, résistance.

2. Discussion

Les cinq isolats produisent un mycélium du substrat non sporulant et non fragmenté. Le mycélium aérien est constitué de filaments ramifiés qui se terminent par des chaînes de spores portés par des sporophores. Ces chaînes sont spiralées.

Chimiquement, les isolats présentent une paroi cellulaire de type IC (Lechevalier et Lechevalier, 1970 b). Le phospholipide diagnostique détecté (phosphatidylethanolamine) correspond au type PII (Lechevalier *et al.*, 1977).

Sur la base des caractéristiques morphologiques et chimiques, les isolats sont rattachés au genre *Streptomyces* décrit par Waksman et Henrici (1943).

Les analyses moléculaires des cinq isolats n'ont pas été réalisées. Leur identification n'a donc pas été achevée et l'on s'est contenté de faire des rapprochements avec les différentes espèces de *Streptomyces* sur la base des critères morphologiques et physiologiques énoncés par Shirling et Gottlieb (1968) et listés dans la clé de Nonomura (1974) spécialement conçue pour l'identification des espèces. Ces mêmes critères phénotypiques ont été utilisés dans les volumes de 1989 et 1994 du Manuel de Bergey pour cette discrimination.

2.1. Comparaison des isolats AH21, AH27, AH28, AH30 et AH40 avec les espèces de *Streptomyces* plus proches.

Les cinq isolats, de par la couleur de leur mycélium aérien, sont classés dans la série des *Streptomyces* "Blanc" et dans la section S par leurs chaînes de spores en forme spiralée. Dans la clé de Nonomura (1974) et dans le Manuel de Bergey (Holt *et al.*, 1994), près de 500 espèces de *Streptomyces* ont été décrites. Seules 37 sont classées dans la série des "blanc". Parmi ces 37 espèces, 25 sont dans la section S et parmi ces dernières, seules 8 espèces sont halotolérantes. Nos isolats se rapprochent beaucoup plus de *S. albus* et *S. rimosus* (isolats ne produisant pas de pigment mélanoïde) (Nonomura, 1974).

La comparaison des cinq isolats avec ces deux espèces est résumée dans le tableau 23.

- Sur 17 tests physiologiques, *S. albus* se distingue des 5 isolats par six à sept différences. Ces tests, selon les cas, sont relatifs à l'amidon, la caséine, la tyrosine, l'arabinose, le mannitol, le raffinose, le rhamnose, la salicine, et la croissance en présence de NaCl et à une température 42°C.
- Sur 12 tests physiologiques, *S. rimosus* se distingue des 5 isolats par six à huit différences selon les cas. Ces tests sont relatifs à l'utilisation de l'arabinose, de l'inositol, du mannitol,

Tableau 23. Caractéristiques physiologiques distinctives des isolats de *Streptomyces* en comparaison avec les espèces phénotypiquement apparentées.

Tests	AH21	AH27	AH28	AH30	AH40	<i>S. albus</i>	<i>S. rimosus</i>
Dégradation de divers composés organiques:							
Caséine	+	+	-	-	+	+	ND
Gélatine	+	+	+	+	+	+	ND
Amidon	+	+	+	+	+	-	ND
Tyrosine	+	-	+	+	+	+	ND
Xanthine	+	+	+	+	+	+	ND
Utilisation des sources de carbone:							
Arabinose	+	+	+	+	-	-	+
Fructose	+	+	+	+	+	+/-	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	+
Mannitol	+	-	+	+	-	+	+
Raffinose	+	-	+	-	+	-	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	-	-
Salicine	+	+	+	+	-	+	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	-
Croissance en présence de NaCl (%):			7-20%			0-15%	0-15%
Streptomycine (10 UI)	S	S	S	S	S	S	R
Croissance à 42°C	-	-	-	-	-	+	ND

Note. +, test positif; -, test négatif; S, sensibilité; R, résistance; non déterminé.

du raffinose, du rhamnose, de la salicine et du xylose, la croissance en présence de NaCl et la résistance à la streptomycine.

Bien que les différences phénotypiques soient importantes, les cinq isolats ne peuvent être identifiés de manière assez sûre qu'après avoir effectué le séquençage de l'ADNr 16S et éventuellement l'hybridation ADN-ADN dans le cas où le séquençage montre un pourcentage de similarité supérieur à 97% avec les espèces connues, comme l'ont indiqué Wayne *et al.* (1987).

3. Conclusion

Les résultats des études morphologiques et chimiques ont permis de rattacher les isolats AH21, AH27, AH28, AH30 et AH40 au genre *Streptomyces*.

Ces isolats sont phénotypiquement proches entre eux, mais les caractères phénotypiques restent insuffisants pour les rattacher à une espèce donnée.

Le séquençage et l'hybridation ADN-ADN sont nécessaires pour la détermination des espèces.

II. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES ISOLATS DE *STREPTOMYCES*

1. Résultats

Les résultats de l'activité antibiotique, évaluée par la méthode des disques d'agar, sont présentés dans le tableau 24. Les isolats AH21, AH27, AH28, AH30 et AH40 présentent une activité très forte à forte contre les bactéries à Gram négatif *Pseudomonas syringae* et *Salmonella enterica*, respectivement. Le diamètre de la zone d'inhibition varie de 15 à 45 mm. Une activité (moyenne) est produite uniquement par les isolats AH21 et AH40 contre *Klebsiella pneumoniae*. Aucune activité n'est détectée contre les bactéries à Gram positif (sauf AH40, assez faible) telles que *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*. Les champignons comme *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Mucor ramannianus*, *Botrytis cinerea* et *Saccharomyces cerevisiae*, ne sont pas inhibés.

Tableau 24. Activité antimicrobienne des isolats de *Streptomyces* AH21, AH27, AH 28, AH30 et AH40 contre divers microorganismes.

Germes tests	Diamètre des zones d'inhibition (mm)				
	AH21	AH27	AH28	AH30	AH40
Bactéries à Gram-positif:					
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	12
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	-	-	-	-	12
Bactéries à Gram-négatif:					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 82.91	15	-	-	-	16
<i>Salmonella enterica</i>	22	18	18	16	17
<i>Pseudomonas syringae</i> N° 1882	45	20	20	24	18
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> N° 2410	-	-	-	-	-
Champignons filamenteux et levure:					
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	-	-	-	-	-
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	-	-	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	-	-	-	-	-

Note. * L'activité a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar.

Le diamètre des zones d'inhibition ne comprend pas le diamètre du cylindre d'agar de 5 mm.

-, absence d'activité. Des disques de milieu de culture non ensemencé par les actinomycètes sont utilisés en tant que témoin.

2. Discussion

Différentes espèces de *Streptomyces* produisent naturellement de très nombreuses molécules présentant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses. Elles sont à l'origine de la production de près des deux tiers des antibiotiques commercialisés (Bérdy, 2005). Elles sont aussi productrices de biomolécules à activités antimicrobiennes telles que les phtalates (El Naggar, 1997, Lee, 2000; Al Bari *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2006; Al Bari *et al.*, 2006; Smaoui *et al.*, 2011a; Smaoui *et al.*, 2011b).

Beaucoup d'espèces de *Streptomyces* halotolérantes ou d'origine marine se sont révélées productrices d'antibiotiques mais peu de travaux ont été réalisés sur les activités antimicrobiennes des *Streptomyces* halophiles.

On peut citer des exemples d'antibiotiques produits par:

- Les *Streptomyces* halotolérants: l'oxytétracycline et la rimocidine, produites par *S. rimosus*, l'actinomycine produite par *S. flavovirens*, la ferrimycine sécrétée par *S. galilaeus* et l'hygromycine B sécrétée par *S. hygrosopicus*. Par ailleurs, on peut également citer *S. fragilis*, producteur d'agents antibactériens, antifongiques, antiprotozoaires et anticancéreux (Pridham and Tresner, 1974).
- Les *Streptomyces* halophiles: les antifongiques (antidermatophytes) produits par *Streptomyces orientalis* DKDVIT1, *Streptomyces aureomonopodiales* DKDVIT2 et *Streptomyces* sp. DKDVIT3 (Deepika, 2009).

3. Conclusion

On peut conclure que l'activité des cinq isolats de *Streptomyces* étudiés dans le cas présent est exclusivement antibactérienne, dirigée essentiellement contre les bactéries à Gram-négatif ce qui est intéressant au vu de la résistance connue de ce type de bactéries à de nombreux antibiotiques.

La très forte activité obtenue contre *Pseudomonas syringae* est particulièrement intéressante au vu de la phytopathogénéicité de cette bactérie.

CHAPITRE III

ETUDE TAXONOMIQUE ET MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ANTIBIOTIQUES DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES HALOPHILES DU GROUPE G3

I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES HALOPHILES DU GROUPE G3

1. Résultats

1.1. Détermination du genre

1.1.1 Étude morphologique

1.1.1.1. Caractéristiques culturelles

Les isolats AH35 et AH10 présentent les mêmes caractéristiques culturelles entre eux (tableau 25). Ils possèdent une bonne croissance (12 jours à 30°C) sur tous les milieux utilisés, à savoir ISP2, ISP4, TSA et CMA. Le mycélium du substrat (MS) est non fragmenté. Le mycélium aérien (MA) est vert-grisâtre clair (ISP2, TSA et amidon-nitrate agar) et jaunâtre (ISP4 et CMA). Le MS est jaune clair sur la plupart des milieux utilisés. Un pigment diffusible est sécrété sur les milieux ISP2 et ISP4 (brun rougeâtre) et sur le milieu amidon-nitrate (brun jaunâtre). La sporulation est abondante sur les milieux amidon-nitrate, TSA et CMA, modérée sur ISP2 et faible sur ISP4.

1.1.1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les deux isolats produisent des spores isolées et sessiles qui se forment individuellement sur des hyphes aériens ramifiés. Les endospores, les sclérotés, les sporanges et les synnemata n'ont pas été observés.

1.1.2. Étude chimiotaxonomique

L'étude chimiotaxonomique des isolats AH35 et AH10 montre la présence de l'isomère DL de l'acide diaminopimélique (*meso* DAP) dans leur paroi cellulaire, mais pas de glycine. L'analyse des hydrolysats cellulaires a permis de détecter l'arabinose et le galactose comme sucres caractéristiques, ainsi que le ribose. Ceci correspond au chimiotype IVA tel que défini par Lechevalier et Lechevalier (1970b). Les phospholipides sont de type PII, caractérisés par la présence de la phosphatidyléthanolamine (Lechevalier *et al.*, 1977).

1.1.3. Identification du genre

Sur la base des caractères morphologiques (présence de mycélium aérien, présence de spores sessiles et isolés) et chimiques (chimiotype IVA, phospholipides de type PII), les isolats AH35 et AH10 sont rattachés au genre *Saccharomonospora* (Nonomura et Ohara, 1971).

Tableau 25. Caractéristiques culturelles des isolats du groupe G3.

Milieux +10% de NaCl	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Pigment diffusible
Extrait de levure-extrait de malt agar (ISP2)	++	Vert grisâtre clair	Jaune pâle	Brun rougeâtre
Amidon-sels inorganiques agar (ISP4)	+++	Jaunâtre	Blanc jaunâtre	Brun rougeâtre
Bacto tryptone-soja agar (TSA)	+++	Vert grisâtre clair	Jaune pâle	Non sécrété
Milieu complexe agar (CMA)	++	Jaune pâle	Jaune pâle	Non sécrété
Amidon-nitrate agar	+++	Vert grisâtre clair	Jaune pâle	Brun jaunâtre

Croissance: + + +, abondante; + +, modérée.

Les isolats AH35 et AH10 présentent les mêmes caractéristiques culturelles et micromorphologique sur tous les milieux utilisés.

1.2. Détermination de l'espèce

1.2.1. Étude physiologique

Le tableau 26 illustre les résultats des tests physiologiques des isolats AH35 et AH10. Leur croissance optimale est observée à 30°C, à pH 7 et en présence de NaCl à une concentration de 7 à 10%. Les souches sont capables de croître à 20% de NaCl et à 42°C (température maximale de croissance), mais incapables de croître à pH 5.

Contrairement à l'isolat AH35, l'isolat AH10 croît à 0 et 5% de NaCl et à pH 9. Les deux isolats utilisent la caséine, l'esculine, la gélatine, le cellobiose, le fructose, le glucose, le lactose, le maltose, le raffinose, le rhamnose, la salicine, l'amidon et la sérine, mais ne dégradent pas l'adénine, la guanine, la testostérone, la tyrosine et le sorbitol.

Les deux isolats se distinguent entre eux par la dégradation de l'adonitol, la xanthine, l'acétate, le citrate, le pyruvate et le succinate (tests positifs uniquement pour l'isolat AH35), et l'arabinose, le galactose, l'inositol, le Tween 80, l'alanine et la proline (tests positifs uniquement pour l'isolat AH10). Les deux isolats réduisent les nitrates, sont résistants au lysozyme (0,005%) et sont sensibles au chloramphénicol (30 µg mL⁻¹), à l'érythromycine (15 UI), à la novobiocine (5 µg mL⁻¹), à la rifampicine (5 µg mL⁻¹), à la streptomycine (10 UI) et à la vancomycine (30 µg mL⁻¹) (tableau 26).

1.2.2. Étude moléculaire

1.2.2.1. Séquençage de l'ADNr 16S et phylogénie

Les séquences des ADNr 16S des isolats AH35 (1533 nucléotides) et AH10 (1416 nucléotides) ont été déterminées et déposées dans la GenBank sous les numéros d'accès FJ968730 et FJ968729, respectivement. Ces séquences ont été comparées avec les espèces de référence des bactéries contenues dans les bases de données génomiques. Les résultats du "BLAST" confirment l'appartenance des isolats AH35 et AH10 au genre *Saccharomonospora* et montrent un taux de similitude allant de 98,5 à 99,5% avec les espèces-types de ce genre.

L'analyse phylogénique par la méthode du "neighbor joining" montre la position des isolats AH35 et AH10 et leur relation avec les souches-types des espèces de *Saccharomonospora* (figure 10). Le taux de similarité le plus élevé est trouvé avec les séquences de *Saccharomonospora iraqiensis* AS 4.1193^T (avec un taux de similarité de 99,4 et 99,1% respectivement avec AH35, AH10), de *S. halophila* DSM 44411^T (99,2 et 98,9%) et de *S. paurometabolica* DSM 44619^T (98,8

et 98,5%). Nous remarquons que nos deux isolats constituent une lignée phylétique distincte pouvant suggérer la présence d'une nouvelle espèce (figure 10).

Tableau 26. Caractéristiques physiologiques des isolats AH10 et AH35.

Tests	AH35	AH10	Tests	AH35	AH10
Dégradation de divers composés organiques:			Utilisation en tant que source d'azote et de carbone:		
Adénine	-	-	Alanine	-	+
Arbutine	+	+	Proline	-	+
Caséine	+	+	Sérine	+	+
Esculine	+	+			
Gélatine	+	+	Décarboxylation des sels de sodium:		
Guanine	-	-	Acétate	+	-
Hypoxanthine	+	+	Benzoate	-	-
Amidon	+	+	Butyrate	-	-
Testostérone	-	-	Citrate	+	-
Tween 80	-	+	Oxalate	-	-
Tyrosine	-	-	Propionate	-	-
Xanthine	+	-	Pyruvate	+	-
			Succinate	+	-
Utilisation des sources de carbone:			Tartrate	-	-
Adonitol	+	-	Production de nitrate réductase	+	+
Arabinose	-	+			
Cellobiose	+	+	Croissance en présence de NaCl (%):		
Fructose	+	+	0	-	+
Galactose	-	+	5	-	+
Glucose	+	+	7	+	+
Inositol	-	+	10	+	+
Lactose	+	+	20	+	+
Maltose	+	+	30	-	-
Mannitol	+	+			
Mannose	+	+	Sensibilité au:		
Mélibiose	+	+	Lysozyme (0,005% p/v)	-	-
Raffinose	+	+	Chloramphénicol (30 µg mL ⁻¹)	+	+
Rhamnose	+	+	Erythromycine (15 UI)	+	+
Ribose	+	+	Novobiocine (5 µg mL ⁻¹)	+	+
Saccharose	+	+	Streptomycine (10 UI)	+	+
Salicine	+	+	Vancomycine (30 µg mL ⁻¹)	+	+
Sorbitol	-	-			
Tréhalose	+	+	Croissance à:		
Xylose	+	+	pH 5	-	-
			pH 9	+	-
			pH 7	+	+
			30 et 42°C	+	+

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

NB: les tests ont été effectués en double.

Figure 10. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les isolats AH35 et AH10 avec les souches-types des espèces du genre *Saccharomonospora*.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les pourcentages du support « bootstrap » effectués par la méthode du « neighbor-joining ». Ne sont donnés que les pourcentages supérieurs à 50%. La barre indique 0,01 substitution par position de nucléotide. Les numéros de séquences des souches sont donnés entre parenthèses. *Prauserella marina*, *Prauserella rugosa*, *Actinopolyspora halophila* et *Actinopolyspora mortivallis* sont données comme exemple d'"outgroup".

2. Discussion

Les isolats d'actinomycètes halophiles AH10 et AH35 produisent sur leur mycélium aérien des spores isolées et sessiles. La présence dans leurs cellules de l'isomère DL de l'acide diaminopimélique et de sucres caractéristiques (arabinose et galactose) montre que ces isolats possèdent le chimiotype IVA (Lechevalier et Lechevalier, 1970b). La présence de la phosphatidyléthanolamine comme phospholipide diagnostique les classe dans le type PII (Lechevalier *et al.*, 1977).

L'ensemble de ces caractéristiques morphologiques et chimiotaxonomiques permet de rattacher les actinomycètes AH35 et AH10 au genre *Saccharomonospora* (Nonomura et Ohara 1971).

Les données phylogénétiques basées sur le séquençage de l'ADNr 16S des deux isolats ont permis de montrer qu'ils sont très proches entre eux, avec un taux de similarité de 99,8%. Cependant, les données phénotypiques montrent des différences très nettes.

Les deux isolats sont proches de l'espèce *Saccharomonospora iraqiensis* AS 4.1193^T (Ruan *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2007), avec un taux de similarité de 99,4 et 99,1% respectivement, mais diffèrent phénotypiquement par la couleur de leur mycélium aérien, leur capacité à utiliser l'esculine, la xanthine, le mannose, le rhamnose et le xylose, leur incapacité à utiliser la tyrosine, leur résistance au lysozyme et leur sensibilité à la vancomycine. Les deux isolats présentent un taux de similarité de 99,2 et 98,9% respectivement avec *S. halophila* DSM 44411^T et diffèrent de cette espèce par leur incapacité à utiliser l'arabinose, le galactose et le xylose et l'absence de croissance à 30% de NaCl (pour AH35) et l'utilisation du xylose, ainsi que la croissance à 0, 5 et 7% de NaCl mais pas à 30% (pour AH10). Ils présentent également un taux de similarité de 98,8 et 98,5% avec *S. paurometabolica* DSM 44619^T et les différences avec cette dernière espèce résident dans l'utilisation de la gélatine, l'amidon, le glucose, le mannitol, le mannose, le mélibiose, le rhamnose, le ribose et le xylose.

La comparaison des caractéristiques culturelles et physiologiques des isolats AH35 et AH10 avec celles des espèces de référence les plus proches de *Saccharomonospora* en utilisant les descriptions de Nonomura et Ohara (1971), McCarthy (1989), Al-Zarban *et al.* (2002b) et Li *et al.* (2003b) est résumée dans le tableau 27.

L'ensemble des caractéristiques morphologiques, chimiotaxonomiques, physiologiques et phylogénétiques nous permettent de dire que nos deux isolats constituent une lignée phylétique distincte pouvant suggérer la présence d'une nouvelle espèce.

Tableau 27. Caractéristiques physiologiques de *Saccharomonospora* AH35 et AH10 en comparaison avec *Saccharomonospora paurometabolica*, *S. iraqiensis* et *S. halophila*.

Caractéristiques	AH35	AH10	<i>S. iraqiensis</i> AS 4.1193 ^T	<i>S. halophila</i> DSM 4411 ^T	<i>S. paurometabolica</i> DSM44619 ^T
Couleur du mycélium aérien	Gris vert clair	Gris vert clair	Blanc	Bleu clair à verdâtre	Gris vert clair
Dégradation de divers composés organiques:					
Esculine	+	+	-	ND	ND
Gélatine	+	+	ND	ND	-
Amidon	+	+	+	ND	-
Tween 80	-	+	+	ND	ND
Tyrosine	-	-	+	ND	ND
Xanthine	+	-	-	ND	ND
Utilisation de source de carbone (1%, w/v):					
Arabinose	-	+	+	+	-
Galactose	-	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+	-
Inositol	-	+	+	ND	ND
Mannitol	+	+	+	+	-
Mannose	+	+	-	+	-
Mélibiose	+	+	ND	+	-
Rhamnose	+	+	-	+	-
Ribose	+	+	+	D	-
Xylose	+	+	-	-	-
Production de nitrate réductase	+	+	ND	ND	+
Croissance en présence de NaCl % (w/v):					
0	-	+	-	-	-
5	-	+	+	-	+
7	+	+	+	-	+
10	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
30	-	-	-	+	-
Résistance au:					
Lysozyme (0,005% w/v)	+	+	-	ND	ND
Vancomycine (30 µg ml ⁻¹)	-	-	+	ND	ND

Note. +, test positif; -, test négatif; ND, non déterminé. NB: les tests sont effectués en double.

Cependant, une hybridation ADN-ADN de nos isolats avec les trois espèces connues de *Saccharomonospora* et également de nos isolats entre eux, nous permettra à l'avenir de savoir si on est en présence d'une ou de deux nouvelles espèces ou encore en présence d'espèces connues.

3. Conclusion

Les résultats des études morphologiques, chimiques et moléculaires ont permis d'identifier les isolats AH35 et AH10 au genre *Saccharomonospora*. Ces isolats n'ont pu être rattachés à aucune des espèces connues appartenant à ce genre. L'espèce la plus proche, *Saccharomonospora iraqiensis*, reste cependant assez distincte de nos isolats aussi bien physiologiquement que phylogénétiquement. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que les isolats AH35 et AH10 représentent de nouvelles espèces. Cependant, seule une hybridation entre les deux isolats et *S. iraqiensis* pourra clarifier leur position taxonomique, à savoir, leur appartenance à cette espèce ou à une (voire deux) nouvelle (s) espèce (s).

II. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

1. Résultats

Les résultats de l'activité antibiotique évaluée par la méthode des disques d'agar sont présentés dans le tableau 28. Les isolats AH35 et AH10 présentent une activité contre les bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas syringae* (très forte), *Klebsiella pneumoniae* et *Agrobacterium tumefaciens*. Seul l'isolat AH35 a montré une activité contre *Salmonella enterica*. Le diamètre de la zone d'inhibition varie de 13 à 45 mm. Aucune activité n'est détectée contre les bactéries à Gram positif telles que *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*. Les champignons comme *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Mucor ramannianus*, *Botrytis cinerea* et *Saccharomyces cerevisiae* ne sont pas inhibés.

2. Discussion

La production de substances antibactériennes chez les membres de la famille des *Pseudonocardiaceae* (auquel appartient le genre *Saccharomonospora*) a été rapportée par Platas (1998), Solanki *et al.* (2008) et Zhao *et al.* (2011). En effet, *Amycolatopsis orientalis* subsp. *orientalis* ATCC 19795^T produit la vancomycine, *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635^T produit l'erythromycine et *Actinopolyspora erythraea* YI M 90600 produit les actinopolysporines A, B et C et la tubercidine. L'espèce-type de *Saccharomonospora*, *S. viridis* (espèce non halophile) produit une molécule nommée thermoviridine présentant des activités biologiques contre divers

Tableau 28. Activité antimicrobienne des isolats AH10 et AH35 contre divers microorganismes.

Germes tests	Diamètre des zones d'inhibition (mm)	
	AH10	AH35
Bactéries à Gram positif:		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	-	-
Bactéries à Gram négatif:		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 82.91	13	13
<i>Salmonella enterica</i> CIP 81.3	-	13
<i>Pseudomonas syringae</i> n° 1882	38	45
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> n° 2410	11	15
Champignons et levure:		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i>	-	-
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	-	-

Note.*L'activité a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar.
Le diamètre des zones d'inhibition ne comprend pas le diamètre du cylindre d'agar de 5 mm.
Un disque de milieu non ensemencé par les actinomycètes est utilisé en tant que témoin.

microorganismes tels que (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, etc. (Schuermans, 1956). Or nos isolats n'ont aucune activité contre les bactéries à Gram positif, en particulier *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* et aucune activité antifongique.

Il est à noter qu'aucune des espèces halophiles de *Saccharomonospora* proche de nos isolats n'a été signalée dans la littérature comme productrices d'antibiotiques jusqu'à l'heure actuelle.

Les deux isolats étudiés possèdent un spectre étroit touchant uniquement les bactéries à Gram négatif. On note de très fortes potentialités inhibitrices contre *Pseudomonas syringae*, germe phytopathogène et assez résistant aux antibiotiques. Par contre aucune activité antifongique n'a été observée.

1. Conclusion

On peut conclure que l'activité des isolats AH10 et AH35 est exclusivement antibactérienne, et plus particulièrement contre les bactéries à Gram négatif pathogènes, telles que *Pseudomonas syringae* (avec une très forte zone d'inhibition). Aucune activité contre les bactéries Gram positif et contre les champignons n'a été détectée.

CHAPITRE IV

**ETUDE TAXONOMIQUE DE L'ISOLAT AH97 DU
GROUPE G4 ET PRODUCTION DE COMPOSES
BIOACTIFS**

I. ÉTUDE TAXONOMIQUE DE L'ISOLAT AH97 DU GROUPE G4

1. Résultats

1.1. Détermination du genre

1.1.1 Étude morphologique

1.1.1.1 Caractéristiques culturelles

Les colonies de l'isolat AH97, cultivé sur divers milieux additionnés de 5% de NaCl à 30°C pendant 7 jours, sont duvetées à compact, avec un diamètre de 1 à 3 mm. La croissance de l'isolat est bonne sur les milieux TSA et CMA. Il présente un mycélium aérien bleu-verdâtre à gris-bleu sur milieu TSA et jaune pâle sur milieu CMA. Le mycélium du substrat est jaune clair sur les deux milieux utilisés. Un pigment diffusible marron foncé à noir est sécrété sur TSA. Aucune croissance n'a été observée sur les milieux ISP2 et ISP4 additionnés de 5% de NaCl.

1.1.1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Le mycélium aérien est constitué de filaments ramifiés qui se fragmentent de manière anarchique en chaînes de spores droites après 10 jours d'incubation à 30°C et un mycélium du substrat ramifié non fragmenté. Les spores sont en bâtonnets et non mobiles. Les endospores, les sclérotés, les sporanges et les synnemata n'ont pas été observés.

1.1.2. Étude chimiotauxonomique

L'isolat AH97 présente un chimiotype IIIC (Lechevalier et Lechevalier, 1970b) caractérisé par la présence de l'isomère DL de l'acide diaminopimélique (*meso* DAP) dans la paroi cellulaire, mais pas de glycine, ainsi que du galactose, du mannose, du glucose et du ribose dans les hydrolysats cellulaires. Le profil de phospholipides est de type PII, caractérisé par la présence de la phosphatidyléthanolamine comme phospholipide majeur ayant une importance taxonomique (Lechevalier *et al.*, 1977).

1.1.3. Identification du genre

Sur la base des caractéristiques morphologiques (présence de mycélium aérien bleu-vert à gris-bleu se fragmentant de manière anarchique en chaînes de spores, avec production de pigment diffusible marron à noir) et chimiques (paroi de type IIIC, phospholipides de type PII), l'isolat AH97 est rapproché du genre *Actinoalloteichus*. Le genre comprend actuellement trois espèces, *A.*

cyanogriseus IFO14455^T, *A. spitiensis* DSM 44848^T et *A. hymeniacidonis* HP A177^T. Aucune de ces espèces n'est halophile.

1.2. Détermination de l'espèce

1.2.1. Étude physiologique

Les propriétés physiologiques de l'isolat AH97 sont indiquées dans le tableau 29. Sa croissance optimale a été observée à 30°C, à pH 7 et en présence de NaCl à une concentration de 5 à 7%. L'isolat est incapable de croître à une concentration de 0 et 10% de NaCl, à pH 5 et à 42°C, et capable de croître à pH 9. Cet isolat hydrolyse un certain nombre de composés tels que l'adénine, l'arbutine, la caséine, l'esculine, la gélatine, l'amidon, la testostérone, le Tween 80, l'arabinose, le cellobiose, le fructose, le galactose, le glucose, le mannitol, le rhamnose, le saccharose, le tréhalose, le xylose, le propionate de sodium, le pyruvate de sodium et le succinate de sodium, mais n'utilise pas la guanine, l'hypoxanthine, la xanthine, la tyrosine, l'adonitol, l'inositol, le maltose, le mannose, le mélibiose, le raffinose, la salicine, le sorbitol, le xylose, l'acétate de sodium, le benzoate de sodium, le butyrate de sodium, le citrate de sodium, l'oxalate de sodium, le tartrate de sodium, l'alanine, la proline et la sérine. L'isolat AH97 réduit les nitrates et est résistant à la novobiocine (5 µg mL⁻¹), la streptomycine (10 UI) et la vancomycine (30 µg mL⁻¹) et sensible au chloramphénicol (30 µg mL⁻¹), à l'érythromycine (15 UI) et au lysozyme (0,005%).

1.2.2. Étude moléculaire: séquençage de l'ADNr 16S et phylogénie

Une séquence de l'ADNr 16S de 1248 nucléotides a été déterminée et déposée dans la GenBank sous le numéro d'accèsion FJ379336. Cette séquence a été alignée avec les séquences contenues dans la base de données de la GenBank. Le "BLAST" montre des taux de similitude entre 95,8 et 98,4% avec les espèces d'*Actinoalloteichus*. Le taux de similitude le plus élevé (98,4%) est obtenu avec *A. hymeniacidonis* HPA177^T, l'espèce la plus proche. L'analyse phylogénétique par la méthode du "neighbor joining" montre la position de l'isolat AH97 et sa relation avec les souches-types des espèces d'*Actinoalloteichus* (Figure 11).

L'arbre phylogénétique indique que cet isolat forme un clade bien distinct avec *A. spitiensis* DSM44848^T (96,2%) et *A. cyanogriseus* IFO14455^T (95,8%), qui sont très différentes de l'isolat AH97 (niveau similitude < 97%), et *A. hymeniacidonis* HPA177^T (98,4%), l'espèce la moins différente. Les résultats suggèrent que notre isolat représente une lignée phylétique distincte. Il diffère significativement de *A. hymeniacidonis* (Zhang *et al.*, 2006) qui est une espèce non halophile.

Tableau 29. Caractéristiques physiologiques de l'isolat AH97.

Tests	Résultats	Tests	Résultats
Dégradation de divers composés organiques :		Utilisation de source de carbone et d'azote	
Adénine	+	Alanine	-
Arbutine	+	Proline	-
Caséine	+	Sérine	-
Esculine	+	Décarboxylation des sels de sodium:	
Gélatine	+	Acétate	-
Guanine	-	Benzoate	-
Hypoxanthine	-	Butyrate	-
Amidon	+	Citrate	-
Testostérone	+	Oxalate	-
Tween 80	+	Propionate	+
Tyrosine	-	Pyruvate	+
Xanthine	-	Succinate	+
Utilisation de sources de carbone:		Tartrate	-
Adonitol	-	Nitrate réductase	+
Arabinose	+	Croissance en présence de NaCl (%):	
Cellobiose	+	0	-
Fructose	+	5	+
Galactose	+	7	+
Glucose	+	10	-
Inositol	-	Sensibilité au:	
Maltose	-	Lysozyme (0,005% w/v)	S
Mannitol	+	Chloramphénicol (30 µg mL ⁻¹)	S
Mannose	-	Erythromycine (15 UI)	S
Mélibiose	-	Novobiocine (5 µg mL ⁻¹)	R
Raffinose	-	Streptomycine (10 UI)	R
Rhamnose	+	Vancomycine (30 µg mL ⁻¹)	R
Ribose	+	Croissance à:	
Saccharose	+	pH 5	-
Salicine	-	pH 7 et 9	+
Sorbitol	-	42°C	-
Tréhalose	+	Température optimale de croissance	30°C
Xylose	-		

Note. +, test positif; -, test négatif; S, sensibilité; R, résistance.



Figure 11. Arbre phylogénique basée sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat AH97 et les souches-types des espèces du genre *Actinoalloteichus*.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les pourcentages du support « bootstrap » effectués par la méthode du « neighbor-joining ». Ne sont donnés que les pourcentages supérieurs à 50%. La barre indique 0,005 substitution par position de nucléotide. Les numéros des séquences des souches sont donnés entre parenthèses.

La séquence de l'isolat AH97 a été déposée au niveau de la GenBank sous le numéro d'accèsion FJ379336. *Amycolatopsis orientalis* est donnée comme un exemple de "outgroup" c'est-à-dire, en tant qu'espèce externe au genre étudié.

1.2.3. Identification de l'espèce

Le séquençage de l'ADNr 16S confirme les résultats des études morphologiques et chimiques, puisque ces derniers ont permis de rapprocher l'isolat AH97 au genre *Actinoalloteichus*. Cet isolat n'a pu être rattaché à aucune des espèces connues d'*Actinoalloteichus*, l'espèce la moins différente étant *A. hymeniacidonis* HPA177^T. Stackebrandt et Goebel (1994) rapportent qu'avec un pourcentage d'homologie compris entre 97 et 99%, l'espèce a une très grande probabilité d'être différente. Le dendrogramme montre que l'isolat AH97 se détache nettement des autres espèces.

La distinction phénotypique des espèces du genre *Actinoalloteichus* est basée principalement sur la couleur du MA, du MS et des pigments solubles, sur la composition membranaire en acides gras et sur quelques caractères physiologiques telle que la dégradation ou non de sucres comme le mannose, le sorbitol et le xylose, ainsi que le citrate et le succinate de sodium.

La comparaison des caractéristiques morphologiques, physiologiques et chimiotaxonomiques de l'isolat AH97 avec celles des souches-types des espèces de référence d'*Actinoalloteichus* indique également que *A. hymeniacidonis* est la moins différente. Cependant, des différences importantes sont enregistrées entre les deux souches (tableau 30). Ces différences concernent la couleur de MA et du MS, la composition en acides gras, la capacité de croître sur le milieu ISP2 et en présence de 0 et 5% de NaCl, la réduction des nitrates et l'utilisation du maltose, du mannose, du sorbitol, du xylose et du citrate de sodium, ainsi que l'incapacité de dégrader l'arabinose et le succinate sodium.

Les résultats montrent clairement que l'isolat AH97 est une espèce à part. Il représenterait très probablement une nouvelle espèce. Une hybridation ADN-ADN avec *A. hymeniacidonis* HPA177^T confirmera ultérieurement son originalité.

Tableau 30. Caractéristiques physiologiques et chimiotaxonomiques distinctives entre l'isolat AH97 et la souche-type d'*Actinoalloteichus hymeniacidonis* HPA177^T.

Caractéristiques	AH97	<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i> HPA177 ^T (Zhang <i>et al.</i> , 2006)
Mycélium aérien	Bleu verdâtre à bleu grisâtre	Brun-gris violacé
Mycélium du substrat	Jaune clair	Brun-noir
Croissance sur ISP2	-	+
Utilisation de:		
Arabinose	+	-
Maltose	-	+
Mannose	-	+
Xylose	-	+
Sorbitol	-	+
Citrate de sodium	-	+
Succinate de sodium	+	-
Réduction des nitrates	+	-
Croissance en présence de NaCl:		
0%	-	+
5%	+	-
Acides gras cellulaire (%):		
C _{17:0}	-	11,0
C _{17:1}	-	19,0
C _{17:0 me cis 9,10}	12,96	-
Iso-C _{15:0}	24,57	6,0
Iso-C _{16:0}	-	16,0

+, test positifs; -, test négatif.

II. PRODUCTION DE COMPOSES BIOACTIFS PAR L'ISOLAT AH97

1.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

1.1.1. Mise en évidence sur milieu solide

L'isolat AH97 a montré un spectre d'activité antimicrobienne assez large (tableau 31). Il est très actif contre les bactéries à Gram positif telles que *Bacillus subtilis*, *B. coagulans* et *Staphylococcus aureus* et contre les champignons filamenteux phytopathogènes et toxigènes tels que *Mucor ramannianus*, *Penicillium glabrum*, *Aspergillus carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. alliaceus* et *A. flavus*. Il est modérément actif contre *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus niger*. Cependant, aucune activité n'a été observée contre *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Candida albicans* et *Botrytis cinerea*.

1.1.2. Cinétique de croissance et de production en milieu TSB

La cinétique de croissance et de production des composés bioactifs est réalisée en milieu TSB (trypticase soy broth) en fioles agitées. Au cours de la fermentation, la croissance (poids sec de la biomasse), l'activité antimicrobienne (méthode de diffusion des puits) et le pH sont mesurés quotidiennement pendant 7 jours. Leur évolution au cours du temps est représentée dans la figure 12.

Deux microorganismes-cibles sont utilisés: *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus* (champignon filamenteux).

Le mycélium de l'isolat AH97 se présente sous forme de pelotes de couleur verdâtre et de dimension variable, le plus souvent de 2 à 3 mm de diamètre. Le filtrat de culture est de couleur brune les 2 premiers jours de fermentation et vire progressivement au vert-olive puis vert-olive-grisâtre foncé. Cette couleur est due à un pigment sécrété dans le milieu extra cellulaire.

Les résultats montrent que la biomasse augmente jusqu'à atteindre un maximum au 3^{ème} jour d'incubation (fin de la phase exponentielle de croissance). Une phase stationnaire est observée entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour, suivie par la suite d'une phase de déclin, d'abord rapide puis plus lente.

L'activité antifongique est détectée dès le 1^{er} jour et atteint un maximum le 3^{ème} jour. L'activité antibactérienne commence et atteint un maximum le 2^{ème} jour de fermentation, puis diminue avant de se stabiliser. Ces activités évoluent en corrélation avec la croissance. Le pH initialement de 7,2 augmente progressivement et atteint un maximum (8,6) le 7^{ème} jour de fermentation.

Tableau 31. Activité antimicrobienne de l'isolat AH97 contre divers microorganismes-cibles.

Microorganismes-cibles	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
Bactéries à Gram positif	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	30
<i>Bacillus coagulans</i> CIP 6625	30
<i>Enterococcus faecalis</i>	17
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	25
Bactéries à Gram négatif	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 8291	14
<i>Salmonella enterica</i> CIP 813	18
<i>Serratia marcescens</i>	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	00
<i>Pseudomonas syringae</i> n° 1882	00
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> n° 2410	00
Levures	
<i>Kluyveromyces lactis</i> K231	13
<i>Candida albicans</i> IPA 200	00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC4226	18
Champignons filamenteux	
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	30
<i>Penicillium glabrum</i>	20
<i>Botrytis cinerea</i>	00
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	23
<i>Aspergillus flavus</i>	20
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 3174	25
<i>Aspergillus alliaceus</i>	24
<i>Aspergillus niger</i>	15

* L'activité a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar. Le diamètre des zones d'inhibition ne comprend pas le diamètre du cylindre d'agar (5 mm). Un disque de milieu non ensemencé par les actinomycètes utilisé en tant que témoin.

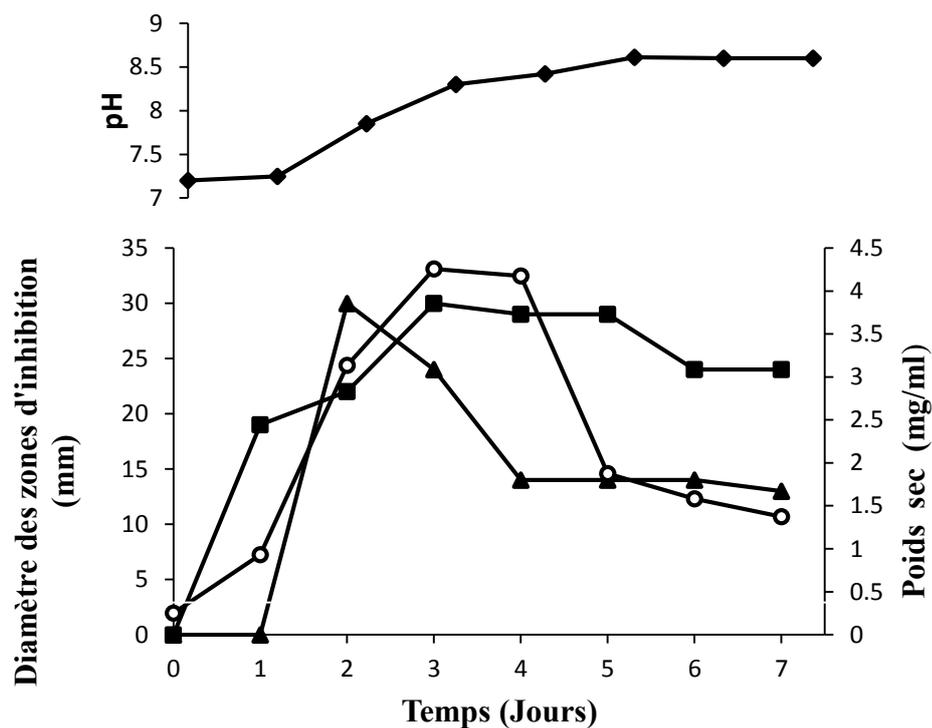


Figure 12. Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques en milieu TSB contenant 5% de NaCl: pH (◆), poids sec (○), activité contre *Bacillus subtilis* (▲), activité contre *Mucor ramannianus* (■). Le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré sans le diamètre des puits qui est de 10 mm.

III. EXTRACTION, DÉTECTION ET PURIFICATION DES COMPOSÉS BIOACTIFS DE L'ISOLAT AH97

1. Résultats

1.1. Extraction des composés bioactifs

L'extraction a été réalisée à partir du mycélium et du filtrat de culture.

1.1.1. Extraction à partir du mycélium

L'extraction des composés bioactifs à partir du mycélium est réalisée avec du méthanol (60 mL de méthanol pour 50 g de mycélium humide et égoutté, provenant de 1 L de culture). L'extrait a une couleur vert-olive comme la couleur initiale du mycélium. Il présente une bonne activité contre *Bacillus subtilis* (26 mm) et *Mucor ramannianus* (20 mm). Ce test d'antibiographie a été réalisé par la méthode des disques de papier et le diamètre du disque (6 mm) n'est pas compris dans les valeurs indiquées.

1.1.2. Extraction des composés bioactifs à partir du filtrat de culture

L'extraction des composés bioactifs à partir du filtrat de culture a été effectuée en utilisant 4 solvants non miscibles avec l'eau et de polarités différentes, certains étant apolaires ou peu polaires (*n*-hexane et dichlorométhane) et d'autres relativement plus polaires (*n*-butanol et acétate d'éthyle).

Les résultats des activités (déterminées par antibiographie) contre *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus* sont présentés dans la figure 13. Les substances actives ne sont pas extraites par le *n*-hexane (dont l'activité reste présente dans la phase aqueuse). Elles sont cependant extraites avec les trois autres solvants, la meilleure activité étant obtenue avec le *n*-butanol.

Pour la suite des études, nous avons donc retenu le *n*-butanol comme solvant d'extraction des activités antifongique et antibactérienne.

1.2. Détection des composés bioactifs par bioautographie

Après extraction des composés bioactifs au *n*-butanol, la phase organique est analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice G60. Les composés bioactifs sont détectés par bioautographie contre *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus*. Deux systèmes de solvants ont été testés. Dans le système de solvant B.A.E. (*n*-butanol-acide acétique-eau, 3:1:1; v/v/v), deux composés à activité antibactérienne et antifongique sont détectés (figure 14). Ils sont désignés TB1 ($R_f = 0,41$) et TM2 ($R_f = 0,44$) et possèdent tous les deux une forte activité antibactérienne et une activité antifongique forte pour TM2 et moyenne pour TB1.

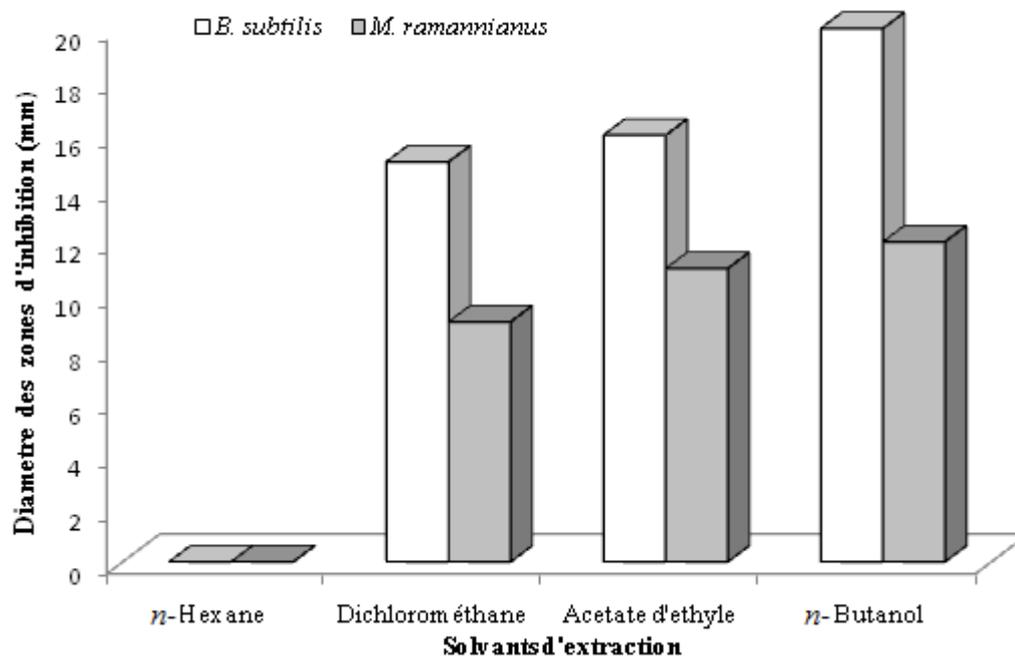


Figure 13. Activités des extraits du filtrat de culture de l'isolat AH97 par différents solvants organiques.

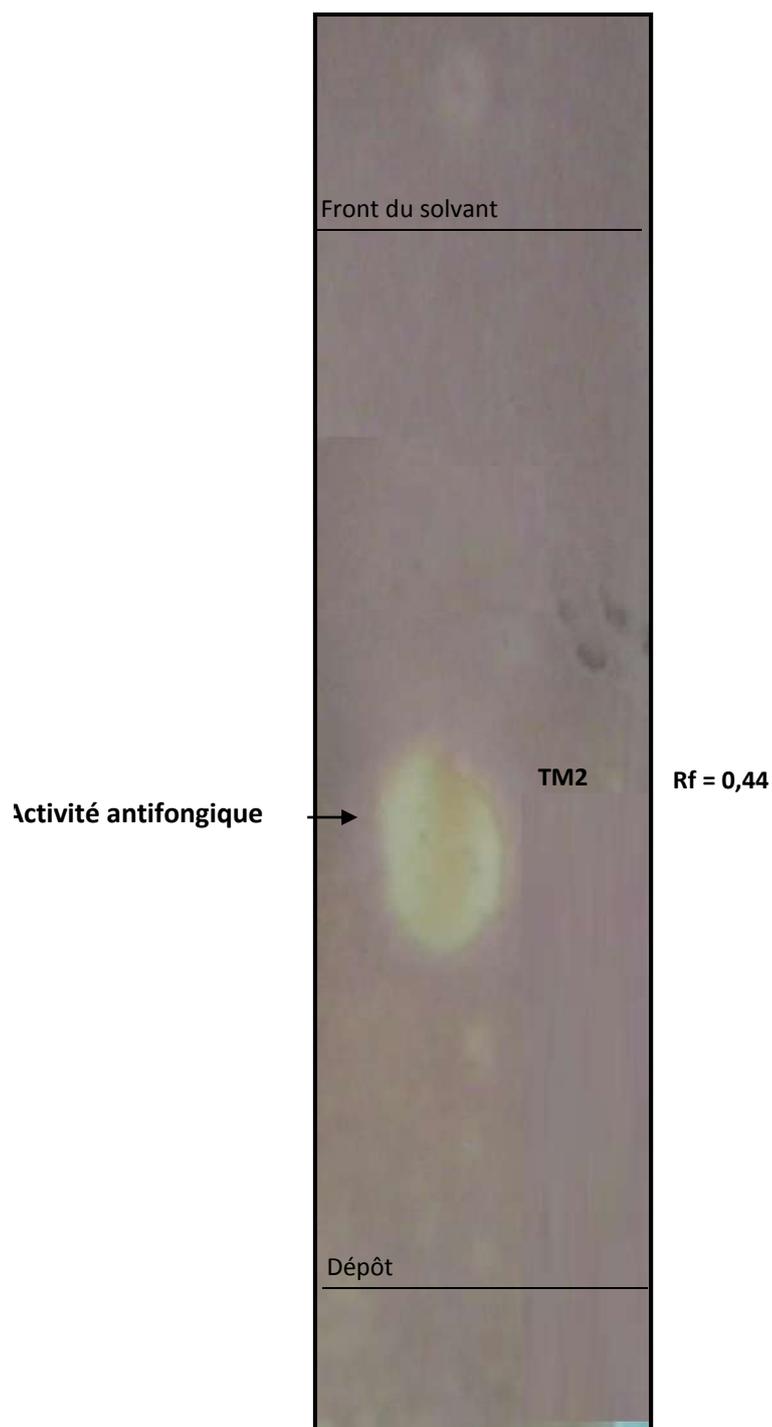


Figure 14. Localisation des activités antibiotiques par bioautographie de l'extrait butanolique. Système de solvant: *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1 v/v/v). ○, Tâches actives contre *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus*.

TM2 est de couleur marron clair et TB1, de couleur jaune pâle. Par contre, dans le système de solvant A.M. (acétate d'éthyle-méthanol, 100:15; v/v), la séparation est moins bonne; de plus la tache TM2 migre très faiblement ($R_f = 0,18$).

1.3. Purification des composés bioactifs

Quinze litres de filtrats de culture sont extraits au *n*-butanol au jour optimal de production (3^{ème} jour). Les substances actives de la phase butanolique sont purifiées par chromatographie sur couche épaisse de gel de silice G60 puis par HPLC. Les activités ont également été extraites (au méthanol) à partir du mycélium, mais elles sont faibles comparées à celles du filtrat de culture.

1.3.1. Semi-purification des composés bioactifs

Les substances actives TB1 et TM2 sont semi-purifiées par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice. L'extrait brut butanolique est alors spoté en bandes. Les plaques sont développées dans le système de solvants B.A.E. Les bandes actives correspondant aux fractions TB1 et TM2 sont récupérées séparément, désorbées dans le méthanol, concentrées à sec et stockées au congélateur avant d'être analysées par HPLC.

1.4.3. Purification des antibiotiques par HPLC

La purification par HPLC n'a été poursuivie que pour la fraction TM2 qui s'est révélée être la plus active. Le chromatogramme du premier tour d'injection (Figure 15a) sur colonne C18 Uptisphere UP5ODB montre deux pics principaux présentant une activité antibactérienne et antifongique. Ces pics sont désignés F1 (fraction hydrophile et blanchâtre) avec un temps de rétention (TR) de 5,00 min, et F2 (fraction hydrophobe et incolore) avec un TR de 25,00 min.

Les fractions F1 et F2 ont été collectées séparément et réinjectées dans le système HPLC avec:

- une colonne C18 (Pyramide, Nucleodur) en vue de purifier la fraction hydrophile F1 avec 100% d'eau comme phase d'élution, en mode isocratique.
- une colonne C18 (Uptisphere UP5ODB) en vue de purifier la fraction hydrophobe F2 avec un gradient linéaire continu de 80 à 100% de MeOH dans l'eau comme phase d'élution.

Les chromatogrammes de purification finale par HPLC sont représentés par les figures (15b et 15c). Ils montrent un pic pour chaque fraction présentant une activité antibactérienne contre *B. subtilis* (F1, 25 mm et F2, 30 mm) et antifongique (F1, 30 mm et F2, 40 mm).

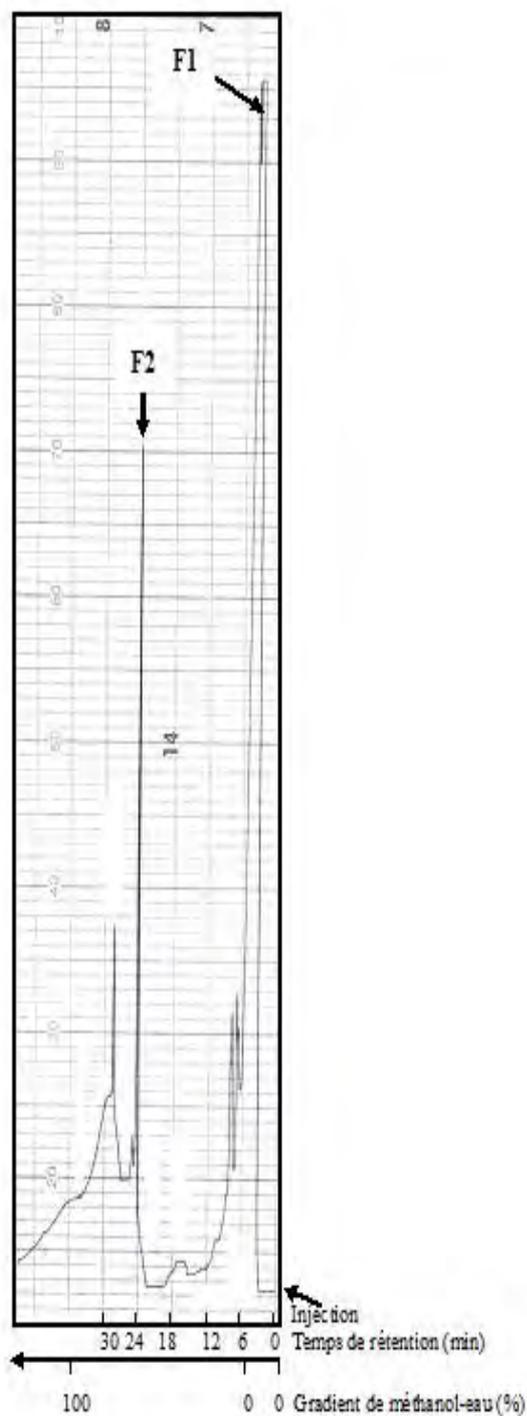


Figure 15a. Profil d'élution en HPLC de la première injection de la fraction active TM2 semi-pure solubilisée dans du méthanol.

Colonne C₁₈ Uptisphere UP50DB, 250 × 7,8 mm, (5 μm), 0% eau en isocratique pendant 6 min (débit 2 mL/min) et gradient linéaire continu de 0 à 100% de méthanol/eau pendant 30 min puis 100% de méthanol pendant 10 min; débit, 2 mL/min; détection, 220 nm

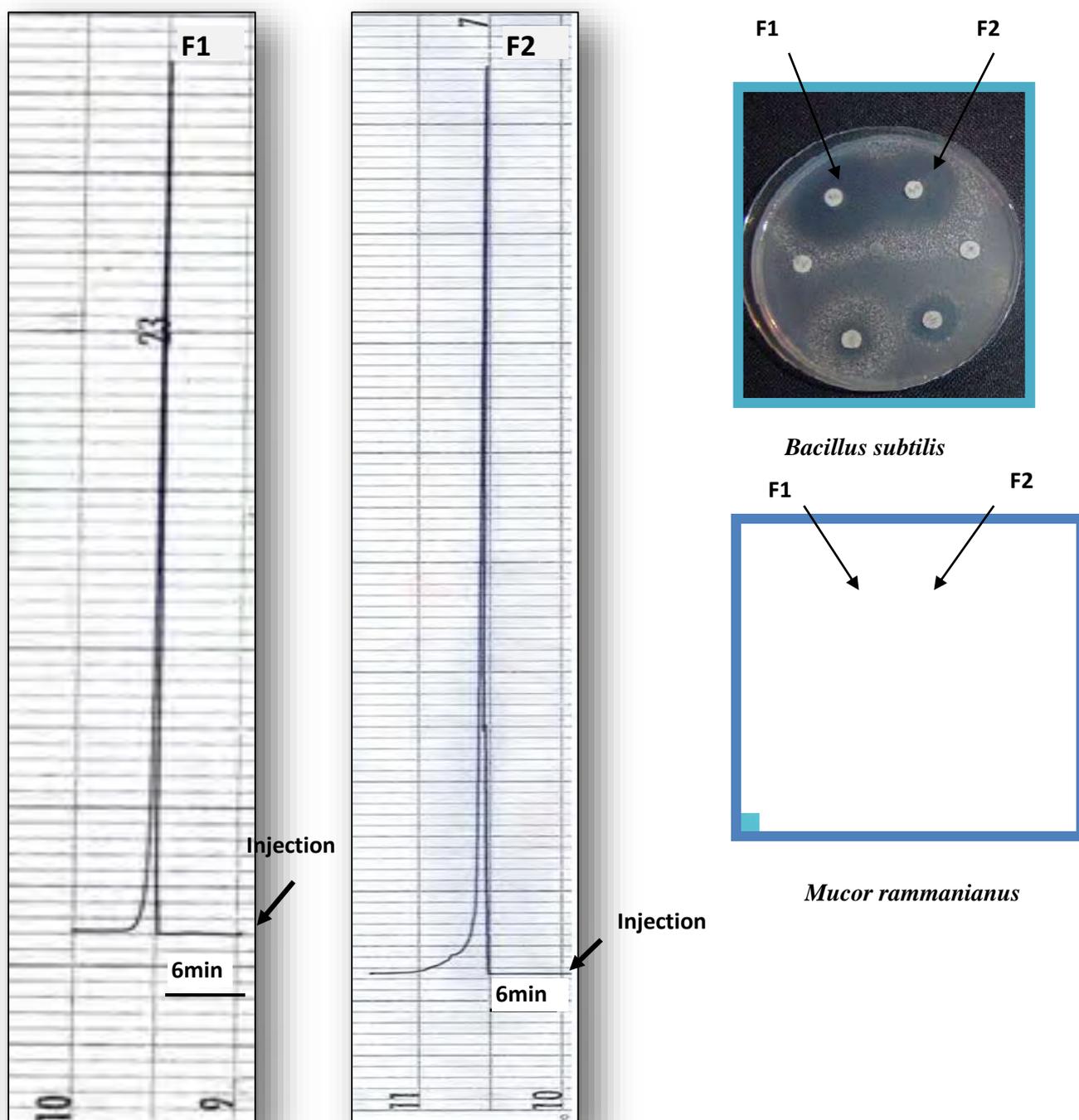


Figure 15b. Profils d'élution en HPLC des dernières injections et purification totale des composés actifs F1 et F2 et tests d'activité contre *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus*.

- **F1:** solubilisée dans l'eau. Sur colonne C₁₈ Nucléodur, 250 × 10 mm, 100% eau en isocratique comme solvant d'élution pendant 30 min, débit 2 mL/min; détection à 220 nm.
- **F2:** Solubilisée dans le MeOH. Sur colonne C₁₈ Uptisphère UP5ODB, 250 × 7,8 mm, 5 µm. Gradient linéaire continu de 80 à 100% de MeOH pendant 20 min; débit 2 mL/min; détection à 220 nm.

1.5. Caractérisation partielle des substances bioactives F1 et F2

1.5.1. Révélations chimiques

La fraction F1 est révélée positivement par le naphtorésorcinol (rose violacé) et la ninhydrine (violet), et négativement par le formaldéhyde-H₂SO₄. Ces résultats montrent que la molécule F1 contient un ou plusieurs sucres et une ou plusieurs amines, mais pas de composés polycycliques aromatiques.

La fraction F2 est révélée négativement par le naphtorésorcinol et la ninhydrine, ce qui indique l'absence de sucres et d'amines libres; elle est par contre révélée positivement par le formaldéhyde-H₂SO₄ (brun foncé) ce qui implique la présence de composés aromatiques.

1.5.2. Spectroscopie en UV-visible

Les spectres UV-visible de l'extrait butanolique brut TM2 (λ_{\max} à 201, 225 et 275 nm), du composé F1 dans de l'eau (pas d'absorption dans l'UV) et du composé actif F2 dans du méthanol (225 et 275 nm) sont présentés dans les figures 16a, 16b et 16c respectivement. L'absence des trois maxima caractéristiques des polyènes (qui ont 3 maxima d'absorption entre 260 et 405 nm) indique que les substances bioactives ne sont pas polyéniques. Les polyènes sont connus pour leur toxicité et leur instabilité, et sont de ce fait écartés des programmes de recherche de nouveaux antifongiques. Le maximum à 275 nm confirme la présence d'au moins un noyau aromatique au niveau de F2. Par contre, F1 ne montre aucune absorption dans l'UV-visible, ce qui indique la présence d'un composé saturé.

1.5.3. Spectroscopie infrarouge

Le spectre d'absorption infrarouge du composé F1 (figure 18a) montre la présence des bandes suivantes: 3390 cm⁻¹ (NH₂), 2933 cm⁻¹ (CH aliphatique), 1675 cm⁻¹ (C-OH), 1543 cm⁻¹ (NH₂), 1347-1030 cm⁻¹(C-N) et 948-673 cm⁻¹ (CH).

Le spectre d'absorption infrarouge du composé F2 (figure 18b) montre la présence des bandes suivantes: 3000-2800 cm⁻¹ (CH), 1800-1600 cm⁻¹ (CO), 1600 cm⁻¹(C=C), 1580 cm⁻¹ (noyau aromatique) et 1300-1200 cm⁻¹ (CO).

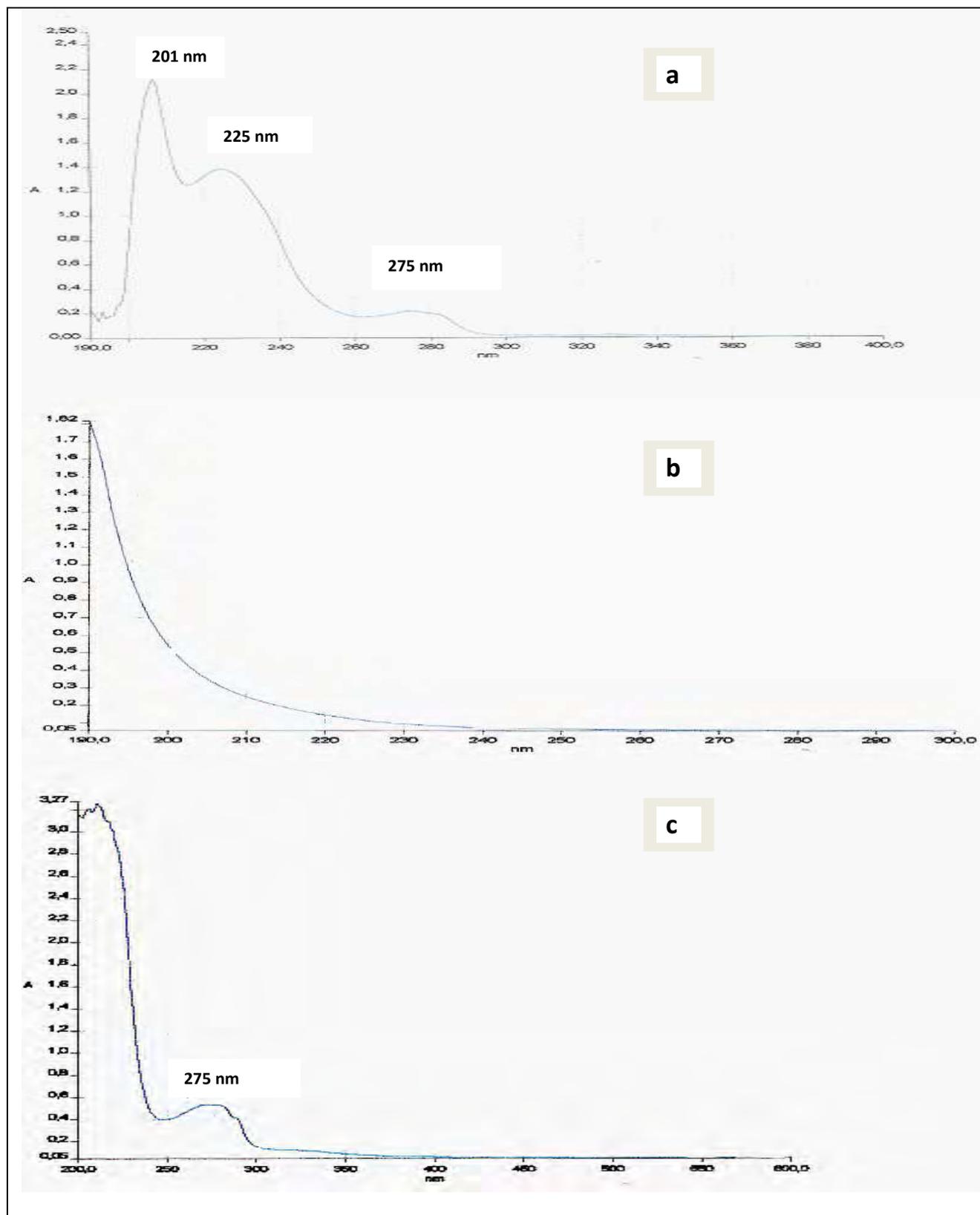


Figure 16. Spectre d'absorption dans l'UV-visible:

- a. de l'extrait butanolique brut de l'isolat AH97 dissous dans du méthanol.
- b. du composé F1 pur (dissous dans de l'eau).
- c. du composé F2 pur (dissous dans du méthanol).

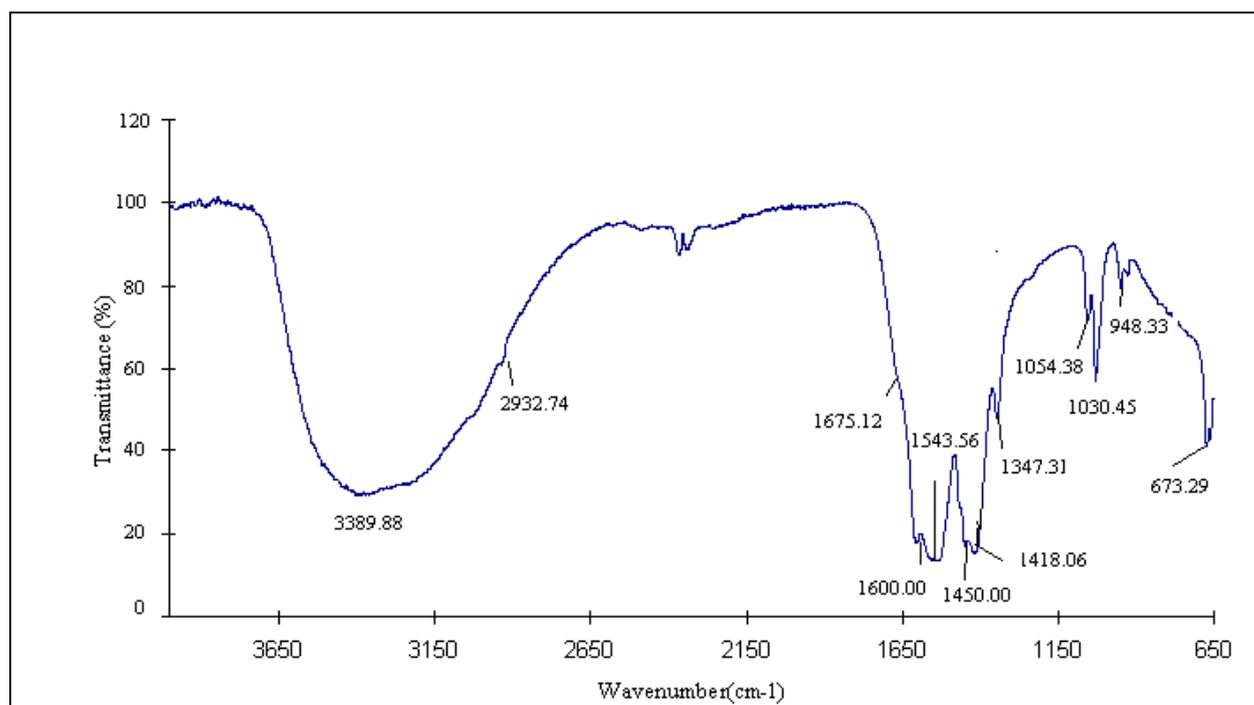


Figure 17a. Spectre d'absorption dans l'infra rouge du composé F1 produit par l'isolat AH97.

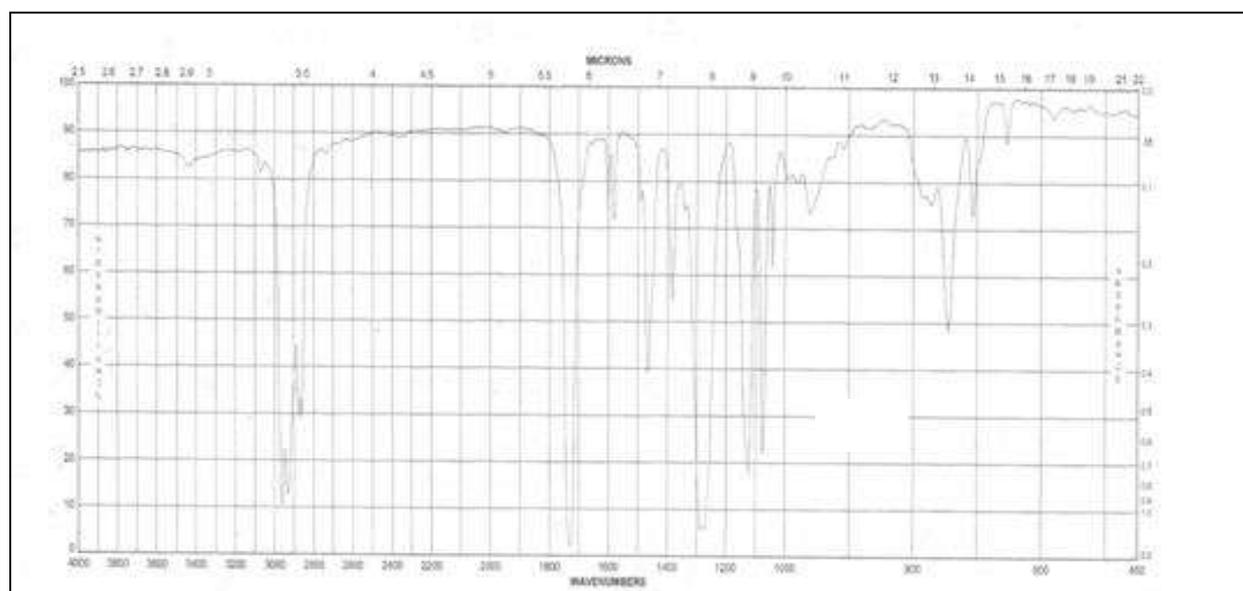


Figure 17b. Spectre d'absorption dans l'infra rouge du composé F2 produit par l'isolat AH 97.

1.5.4. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse du composé F1 réalisé par "nano-electrospray ionisation" (mode positif) est illustré par la figure 18. Il indique un pic moléculaire à $m/z = 850$ avec des fragments à $m/z = 686$ et 522 . La fragmentation du pic majoritaire en mode positif montre des écarts entre les ions à m/z 162-164, ce qui correspondrait vraisemblablement à des sucres en C6.

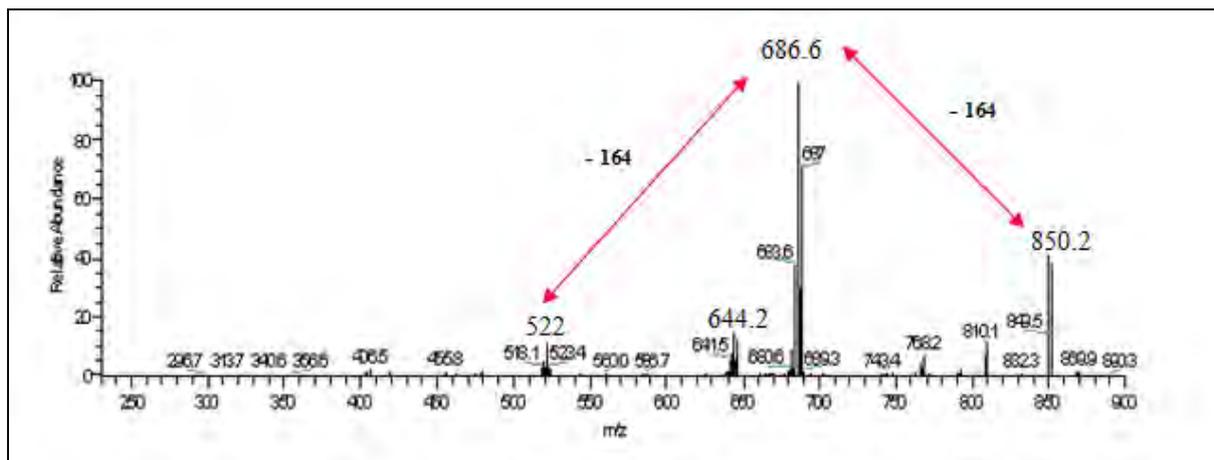


Figure 18. Spectre de masse du composé F1

Le spectre de masse du composé F2 montre un pic moléculaire à m/z 390.

1.5.5. Spectroscopie RMN ^1H

Le spectre de RMN ^1H du composé F1 pur indiquerait la présence de sucre. La grande majorité des signaux des protons résonnent entre 3,3-4,2 ppm et la majorité des signaux de carbone résonnent entre 50-80 ppm. Ces signaux sont caractéristiques des groupes CH (OR), CH (OH) et CH₂ (OR). Il y a aussi des signaux d'environ 100 ppm de carbone (carbone lié à deux atomes d'oxygène) et des signaux à 170-180 ppm identifiés à un groupe -O-C-OCH (CH₃).

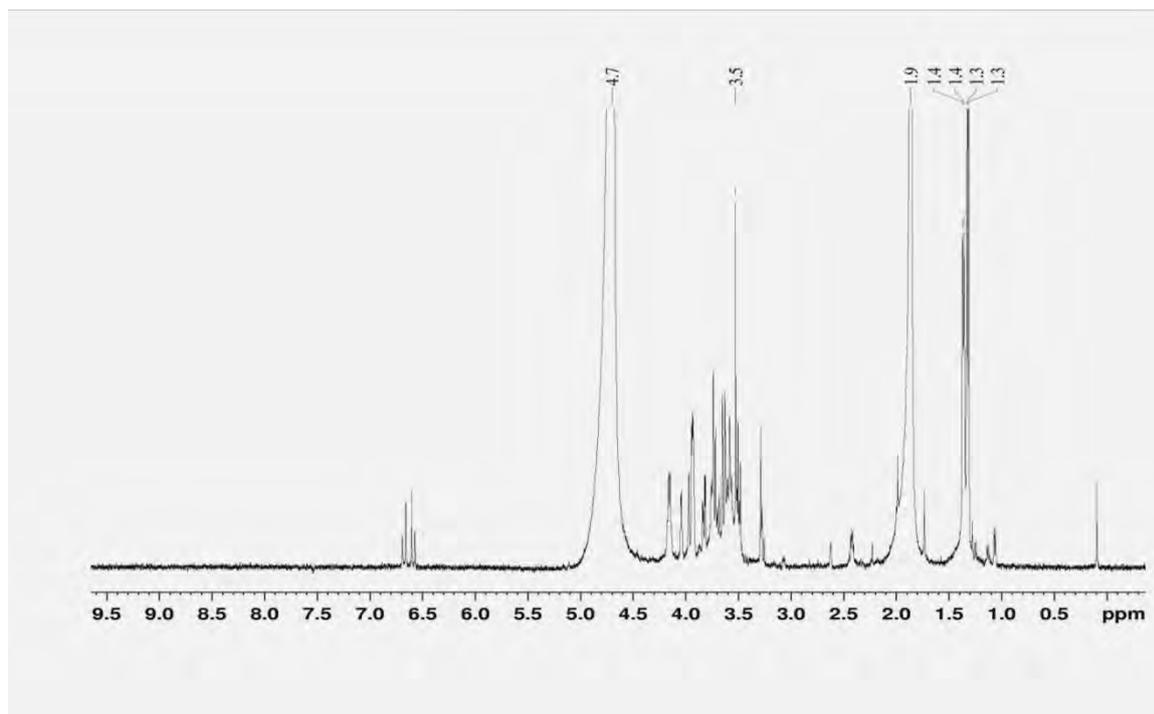


Figure 19a. Spectre ^1H RMN du composé bioactif F1 dans de l'eau deutériée (D_2O).

Le spectre RMN ^1H du composé F2 pur (Figure 19b) indique la présence de groupe méthyle à 0,94-0,98 ppm, de groupe éthyle à 1,37-1,47 ppm, CH à 1,70-1,71 ppm, $(\text{CH})_3\text{-COH}$ à 3,32-3,37 ppm, O-CH_2 à 4,24-4,25 ppm, OH à 4,85 ppm et d'un cycle aromatique à 7,64-7,75 ppm.

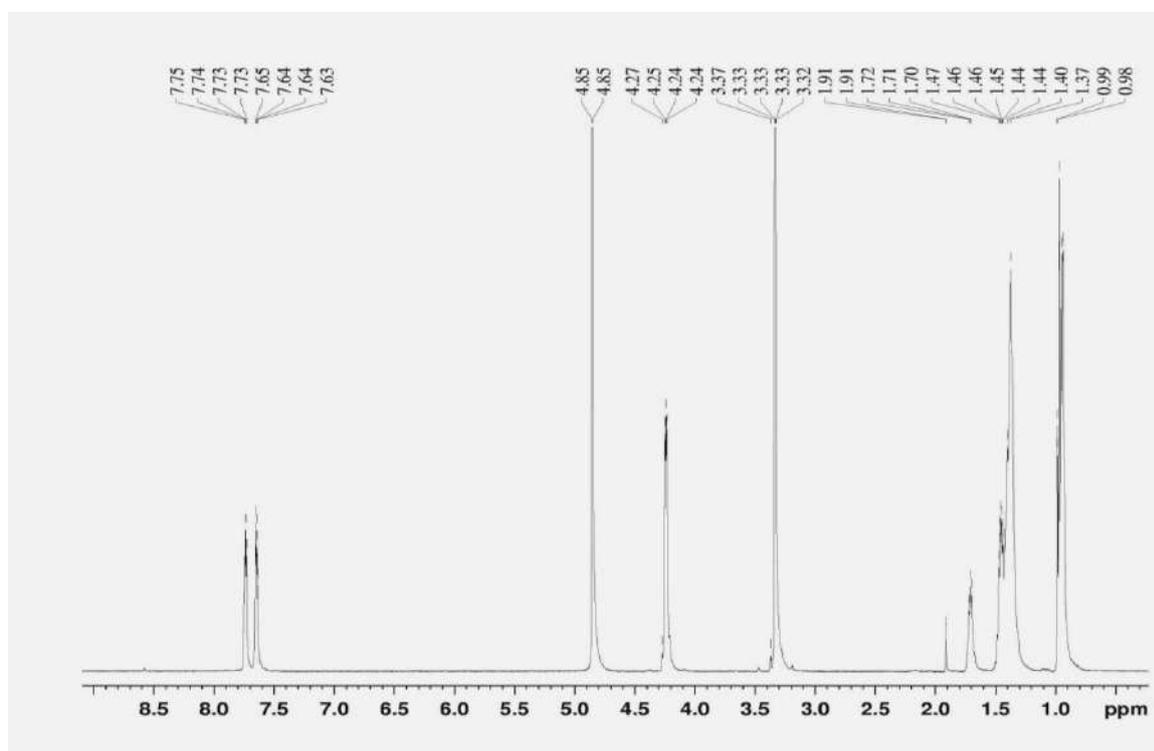


Figure 19b. Spectre ^1H RMN du composé bioactif F2 dans du méthanol deutériée (MeOD).

2. Discussion

Les données relatives aux révélations chimiques et aux spectres infrarouge, de masse et de RMN du proton montrent que:

Pour la fraction F1:

Les réactions chromogéniques sont positives avec le naphthorésorcinol- H_2SO_4 et la ninhydrine (présence de sucres et d'amines). L'absence d'absorption dans UV-visible montre la présence d'un composé saturé. Le spectre d'absorption infrarouge indique la présence de fonctions hydroxyles, de groupements CH, C-OH et de fonction amine. Le spectre de RMN 1H a montré la présence de CH (OR), CH (OH) et CH₂ (OR), ainsi que de -O-C-OCH (CH₃). De plus, le composé F1 est blanchâtre, hydrophile et très soluble dans l'eau.

L'ensemble de ces caractéristiques montre que F1 est un composé osidique, aminé et méthylé.

D'après la classification de Bérdy *et al.* (1987), l'antibiotique F1 appartient à la famille n° 1 (antibiotiques osidiques) et la sous-famille n° 2 (antibiotiques aminosidiques). Il s'agit vraisemblablement d'un aminoside.

Pour la fraction F2:

Les réactions chromogéniques avec le naphthorésorcinol- H_2SO_4 et la ninhydrine sont négatives (absence de sucres et d'amines). Le spectre UV-visible dans le méthanol du produit pur montre des maxima à 225 et 275 nm, ce qui suggère la présence d'un noyau aromatique et l'absence de structure polyénique. Le spectre d'absorption infrarouge indique la présence de CH, de CO, et de noyau aromatique. Le spectre de masse a donné un poids moléculaire de 390. Le spectre RMN du proton a montré la présence de méthyle, d'éthyle, de CH-(CH₂)₃-O-CH₂ et de cycle aromatique. Sur la base des données spectrales et de recherche dans la littérature, la fraction F2 a été identifiée au dioctyle phtalate (Figure 20), qui a le même spectre UV-visible et infrarouge, le même poids moléculaire et le même spectre RMN 1H . Le composé F₂ est incolore et d'aspect huileux. Les composés phtalates sont des produits pétrochimiques utilisés comme plastifiants, agent antimousse, comme composant des vernis à ongles, dans la fabrication du matériel médical, etc.

Néanmoins, plusieurs dérivés de phtalates ont été isolés à partir d'organismes terrestres et marins, y compris les plantes (Lee, 2000; Lee *et al.*, 2000), les algues marines (Sastry et Rao, 1995), le bouillon de culture des champignons et de bactéries en particulier celles appartenant au genre *Streptomyces* (Lee, 2000). Comme exemple, nous pouvons citer le dérivé dibutyl phtalate

produit par quatre souches de *Streptomyces*: *Streptomyces nasri* H35 (El Naggar, 1997), *S. melanosporofaciens* (Lee, 2000), *S. albidoflavus* (Roy *et al.*, 2006), *S. bangladeshensis* (Al Bari *et al.*, 2006), *Streptomyces* sp. TN256 (Smaoui *et al.*, 2011a) et *S. lilaceus*. TN17 (Smaoui *et al.*, 2011b).

Nos expériences ont été répétées 3 fois à différentes périodes afin de confirmer que le dioctyle phtalate produit par l'isolat AH97 est un produit naturel et non pas une impureté.

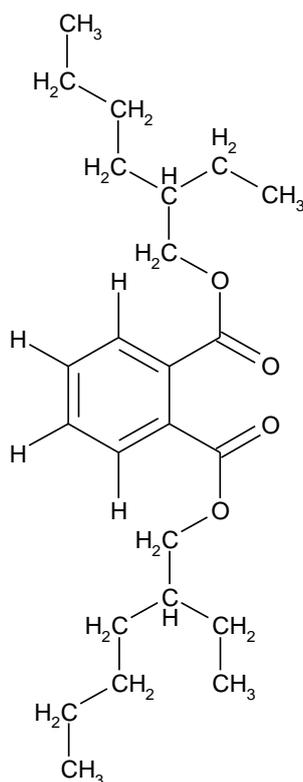


Figure 20. Structure chimique du dioctylphtalate (Sigma Aldrich, 2011).

3. Conclusion

Une nouvelle souche d'actinomycète modérément halophile, nommée AH97, isolée d'un sol salé saharien, a été identifiée par une étude polyphasique au genre *Actinoalloteichus*. L'analyse de la séquence ADN_r 16S de cet isolat a montré un niveau de similarité de 98,4% avec *A. hymeniacidonis*, qui est l'espèce la moins différente. Cependant, la souche AH97 présente de grandes différences morphologiques, physiologiques et chimiques avec cette espèce. Elle a montré une activité antibactérienne et antifongique à large spectre contre divers microorganismes et produit deux composés bioactifs, F1 (hydrophile) et F2 (hydrophobe), le premier étant un composé aminosidique et le second, du dioctyle phtalate.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

De nouveaux médicaments, notamment les antibiotiques, sont nécessaires pour contrer et éviter la propagation d'agents pathogènes résistants à ces composés bioactifs (Talbot *et al.*, 2006; Payne *et al.*, 2007) et pour lutter aussi contre certaines maladies mortelles, comme par exemple le cancer (Olano *et al.*, 2009). Il est admis que la plupart des sources prometteuses de nouveaux médicaments sont des produits naturels (Bull *et al.*, 2000; Fenical et Jensen, 2006; Bull et Stach, 2007). L'expérience a montré que d'importants produits naturels, jusque-là inconnus, sont trouvés lorsque de nouveaux systèmes de dépistage sont introduits ou quand du matériel biologique de qualité à partir de nouvelles sources est examiné.

Parmi les procaryotes, les membres de l'Ordre des *Actinomycetales*, notamment du genre *Streptomyces*, demeurent la source la plus riche de produits naturels, y compris des antibiotiques cliniquement utiles et des agents antitumoraux (Bérdy, 2005; Newman et Cragg, 2007; Olano *et al.*, 2009). Les actinomycètes représentent une source d'environ 45% de tous les métabolites secondaires microbiens bioactifs, 7600 de ces composés (80%) étant produits par le genre *Streptomyces* (Bérdy, 2005).

L'accent est encore une fois mis sur les actinomycètes comme représentant une nouvelle source de produits naturels cliniquement importants. Toutefois, il est de plus en plus difficile de trouver ces métabolites à partir d'actinomycètes très répandus comme le genre *Streptomyces*. Ce problème peut être résolu par l'isolement sélectif d'actinomycètes rares à partir d'habitats peu étudiés, car il est de plus en plus évident que les membres de ce phylum sont parmi les plus grands colonisateurs de tous les milieux dans les biosphères-extrêmes, constituant souvent une population dominante (Bull, 2011).

Les actinomycètes sont d'une grande importance dans les processus biotechnologiques. Ceci est dû à leur capacité de produire un nombre important d'antibiotiques ainsi que d'autres métabolites secondaires bioactifs. Une attention particulière a été focalisée sur les actinomycètes qui poussent dans les conditions extrêmes, parmi lesquels on distingue les actinomycètes halophiles qui représentent un potentiel de biosynthèse intéressant et profitable de substances bioactives utilisables dans divers domaines.

Ce travail entre dans le cadre de l'axe de recherche, du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, qui vise à l'étude des actinomycètes rares des sols sahariens d'Algérie du point de vue taxonomique, écologique, production, identification et activité des molécules antifongiques et antibactériennes. En effet, de nombreuses études ont été entreprises par notre équipe de recherche qui ont abouti à l'isolement de plusieurs

nouvelles espèces et de plusieurs nouvelles molécules antibiotiques (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998; Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004a,b et 2005; Badji *et al.*, 2005; 2006a,b et 2007; Boudjella *et al.*, 2006, 2007 et 2010; Merrouche *et al.*, 2010 et 2011; Boubetra *et al.*, 2012).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à l'étude des actinomycètes d'environnements salés, les actinomycètes halophiles, qui occupent une place importante en raison de leur diversité et de leur capacité à produire de nouveaux métabolites. Ils représentent une source potentielle de molécules actives nouvelles (antibiotiques, osmorégulateurs, enzymes, etc.), qui peuvent être utilisées dans les domaines médicaux, pharmaceutiques, agronomiques et alimentaires (Daane *et al.*, 2001; Bursy *et al.*, 2008; Singh, 2006; Deepika et Kannabiran, 2010; Setati, 2010; Parthasarathi *et al.*, 2011).

Nos travaux de thèse convergent vers cette optique. Ils avaient comme objectif d'étudier la taxonomie de quarante trois isolats d'actinomycètes halophiles provenant de différents échantillons de sols salés sahariens du point de vue phénotypique et phylogénétique, ainsi que la production de composés bioactifs par l'un des isolats.

L'identification des actinomycètes halophiles producteurs d'antibiotiques a été effectuée par une approche polyphasique incluant une étude morphologique (macro et micromorphologique), une étude chimiotaxonomique (analyse des constituants cellulaires), une étude physiologique et une étude moléculaire basée sur le séquençage de l'ADNr 16S (avec étude phylogénétique).

Sur la base d'une étude macro et micromorphologique, les 43 isolats ont été classés dans quatre groupes morphologiques (G1 avec 35 isolats, G2 avec 5 isolats, G3 avec 2 isolats et G4 avec 1 isolat) comprenant chacun des isolats semblables morphologiquement et représentant probablement les mêmes taxons.

Les 35 isolats ont été rattachés au genre *Nocardiopsis*, 5 au genre *Streptomyces*, 2 au genre *Saccharomonospora* et un au genre *Actinoalloteichus*.

Plusieurs travaux indiquent que les espèces halophiles et halotolérantes du genre *Nocardiopsis* ont été isolés à partir d'échantillons de divers sols salés, de marais salants et de sédiments salés (Yassin *et al.*, 1993; Al Tai et Ruan, 1994; Chun *et al.*, 2000; Al Zarban *et al.*, 2002a; Li *et al.*, 2003a; Li *et al.*, 2004; Sabry *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Hozzein et Goodfellow, 2008; Yassin *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009; Yamamura *et al.*, 2010; Hamedi *et al.*, 2010 et Chen *et al.*, 2010a). Il en est de même, pour les membres du genre *Saccharomonospora* (Al Zarban *et al.*, 2002b; Li *et al.*, 2003b; Syed *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010) et les membres du genre *Streptomyces*

(Pridham et Tresner, 1974; Lacey et Lacey, 1987; Sonya *et al.*, 2005 et Deepika et Kannabiran, 2009a). Par contre aucun des membres du genre *Actinoalloteichus* n'a été isolé des sols salés.

Après une étude préliminaire, 32 isolats ont été sélectionnés pour une étude approfondie de leur taxonomie. Il s'agit de 24 isolats du genre *Nocardiopsis*, 5 du genre *Streptomyces*, 2 du genre *Saccharomonospora* et un du genre *Actinoalloteichus*. L'identification de ces 32 isolats a été effectuée par des études morphologique, chimique, physiologique et moléculaire (sauf les 5 isolats de *Streptomyces* où l'étude moléculaire n'a pas été effectuée).

Le genre *Nocardiopsis* comprend 42 espèces valides avec 19 espèces halophiles. Le genre *Saccharomonospora* comprend 9 espèces valides avec 6 espèces halophiles. Le genre *Streptomyces* avec 604 espèces valides, renferme un grand nombre d'espèces halotolérantes et quelques espèces halophiles. Le genre *Actinoalloteichus* comprend 4 espèces valides non halophiles.

Parmi l'ensemble des isolats, 24 appartenant au genre *Nocardiopsis*, 2 au genre *Saccharomonospora* et un au genre *Actinoalloteichus*, ont fait l'objet d'une analyse moléculaire. Les séquences de l'ADNr 16S ont été déterminées et comparées avec celles des autres espèces de référence des genres correspondants, disponibles dans la banque de données GenBank.

Les résultats obtenus ont confirmé ceux des études morphologiques, physiologiques et chimiques. Ils ont montré l'appartenance des 24 isolats au genre *Nocardiopsis* (avec des pourcentages de similarité avec les espèces les plus proches variant de 97,6 à 99,7%), des 2 isolats au genre *Saccharomonospora* (avec des pourcentages de similarité variant de 98,5 à 99,5%) et d'un isolat au genre *Actinoalloteichus* (pourcentages de similarité entre 96,2 et 98,4%). Onze isolats pourraient représenter de nouvelles espèces. L'hybridation ADN-ADN entre nos isolats et les espèces les moins différentes du point de vue phylogénétique permettra de s'assurer quant à leur éventuelle originalité.

Les 5 isolats de *Streptomyces* n'ont pas été étudiés du point de vue moléculaire; ils feront l'objet d'autres travaux ultérieurement.

L'étude de l'antagonisme par la méthode des disques d'agar de 32 isolats d'actinomycètes halophiles a mis en évidence un potentiel de production de substances antimicrobiennes. Toutes les souches d'actinomycètes halophiles sont douées d'activités antibiotiques (antibactérienne et/ou antifongique) contre plusieurs germes pathogènes.

Les souches d'actinomycètes les plus intéressantes sont celles actives contre les microorganismes pathogènes ou toxigènes, tels *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus*.

Après ces études sur la taxonomie et les propriétés antimicrobiennes, un isolat rattaché au genre *Actinoalloteichus* et présentant une activité antibiotique intéressante, a été sélectionné pour une étude approfondie de ses antibiotiques. Il s'agit de l'isolat AH97. Ce dernier a montré une forte activité antibactérienne et antifongique.

La production en milieu liquide des composés bioactifs sécrétés par l'isolat AH97 et leurs purifications par diverses techniques chromatographiques, notamment HPLC, ont permis d'obtenir deux produits (F1 et F2) de nature chimique différente. Ces produits ont été caractérisés par des méthodes physico-chimiques et spectroscopiques (UV-Visible, Infrarouge, spectrométrie de masse et RMN du proton). L'UV-visible de l'extrait brut et des composés F1 et F2 n'a pas montré les trois maxima d'absorption caractéristiques des polyènes (Dinya et Sztaricskai, 1986). Ce résultat est intéressant car les molécules polyéniques sont indésirables dans les programmes de criblage de nouvelles molécules bioactives en raison des problèmes liés à leur toxicité, à leur instabilité et à leur mauvaise solubilité. Les composés F1 et F2 exercent une action antibactérienne et antifongique et présentent un spectre plus ou moins large contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, contre les levures et contre les champignons. Les deux produits sont sécrétés en phase exponentielle et stationnaire, en présence de 10% de NaCl.

Le composé F1 correspond à un aminoside. Il possède une activité intéressante contre les bactéries, les levures et les champignons toxigènes et pathogènes pour l'homme. Cette substance bioactive est très soluble dans l'eau et le diméthylsulfoxyde et insoluble dans les solvants organiques. Sa purification a été difficile en raison de sa liaison extrêmement forte avec les sels, ce qui a rendu ainsi sa purification par HPLC et la détermination de sa structure très difficile. En effet, on est parvenu à savoir qu'il s'agit d'un aminoside mais sans pour autant déterminer sa structure.

Le composé F2 correspond à un produit aromatique substitué à une chaîne aliphatique. Il est extrait par le *n*-butanol et possède une forte activité antifongique, particulièrement contre les champignons phytopathogènes et toxigènes, ainsi qu'une activité antibactérienne. La comparaison de ses caractéristiques avec les antibiotiques décrits dans la littérature, basée sur les données spectroscopiques et leur activité, nous a permis de conclure qu'il ne s'agit pas d'un antibiotique mais d'un produit chimique dont la structure est identique au dioctyl phtalate, qui est un produit pétrochimique utilisé comme plastifiant. Trois essais (à des temps différents) ont été nécessaires pour conclure que c'est un produit naturel et non pas une contamination. Plusieurs travaux dans la littérature ont signalés la production de dérivés de phtalates à partir d'organismes terrestres et marins, y compris les plantes (Lee *et al.*, 2000), les algues marines (Sastry et Rao, 1995) et les *Streptomyces* (Smaoui *et al.*, 2011a, b).

L'ensemble des résultats obtenus donne un aperçu général sur le potentiel de l'isolat AH97 du genre *Actinoalloteichus* à produire des antibiotiques et des phthalates actifs contre plusieurs microorganismes.

Les perspectives qui découlent de ce travail sont nombreuses. Ils encouragent la poursuite des études selon trois grandes lignes, l'une relative à l'isolement sélectif des souches d'actinomycètes à partir d'écosystèmes extrêmes, la seconde à leur taxonomie et la troisième aux antibiotiques ou substances bioactives qu'elles secrètent et ce, sur plusieurs aspects:

- La recherche continue de nouvelles souches halophiles d'actinomycètes rares en améliorant les méthodes de sélection et en diversifiant les sols salés et les écosystèmes sahariens. Le NaCl peut aussi être utilisé à différentes concentrations, même à saturation, comme agent sélectif.

- La réalisation de l'hybridation ADN-ADN entre nos isolats et les espèces de référence phylogénétiquement les moins différentes et appartenant aux genres *Nocardiopsis*, *Saccharomonospora* et *Actinoalloteichus*, pour confirmer l'originalité de nos souches. En effet, les isolats AH12, AH19, AH24, AH26, AH37, AH38, AH46, AH63, AH64, AH35 et AH97 se distinguent des espèces connues par leurs caractéristiques culturelles, physiologiques et surtout phylogénétiques (séquençage de l'ADNr 16S), laissant ainsi entrevoir la possibilité de 11 nouvelles espèces qu'il faudra confirmer par hybridation ADN-ADN.

- L'optimisation de la production des antibiotiques en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources carbonées et azotées, éléments minéraux, aération, pH, etc.).

- Il serait aussi intéressant de développer des méthodes adéquates de purification pour les antibiotiques des souches halophiles où le NaCl entrave la purification et la rend très difficile surtout dans le cas des molécules hydrophiles solubles uniquement dans l'eau. L'application de la dialyse est ainsi nécessaire. La détermination, après obtention de quantités pures suffisantes, des structures chimiques des antibiotiques sécrétés à activités intéressantes, en particulier les antifongiques qui se sont avérés de nature non polyénique, et ce, pour certaines souches de *Nocardiopsis* et *Saccharomonospora* et aussi de l'antibiotique aminosidique de la souche AH97 d'*Actinoalloteichus*.

- La réalisation des tests complémentaires (antitumoraux, antiviraux, inhibition d'enzymes, etc.) afin de déterminer le spectre d'action de chacun des antibiotiques.

- La réalisation des tests de génotoxicité vis-à-vis des cellules animales, avant de prétendre à une application possible de nos antibiotiques.