

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITE KASDI MERBAH- OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



Année : 2017/ 2018
N°d'enregistrement :
.....

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat ès Sciences

en Biologie

Présentée par

M^{me} BOUAZIZ Sabrina

Recherche de souches bactériennes locales productrices de substances antimicrobiennes : isolement, sélection, identification des souches actives et caractérisation partielle des substances bioactives.

Soutenue publiquement

Le : 04/03/ 2018

Devant le jury :

M ^{me} SIBOUKEUR Oumelkheir	Professeur	Univ. Ouargla	Président
M ^r BENALLAOUA Said	Professeur	Univ. Bejaia	Directeur de thèse
M ^r OULD EL HADJ Mohamed Didi	Professeur	Univ. Ouargla	Co-directeur de thèse
M ^r KECHA Mouloud	Professeur	Univ. Bejaia	Examineur
M ^{me} OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Professeur	Univ. Ouargla	Examinatrice
M ^r OUAHRANI Mohamed Ridha	Professeur	Univ. El Oued	Examineur

Année Universitaire : 2017/2018

*« Le rôle de l'infiniment petit est
infiniment grand. »*
Louis Pasteur.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu « Allah » Tout Puissant, le Généreux et le miséricordieux pour m'avoir donné la force, la patience, la volonté et le courage de terminer ce modeste travail, et pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche du savoir et de la science.

*Je tiens à remercier très chaleureusement mon directeur de thèse, monsieur le professeur **BENALLAOUA Said**, qui, malgré ses nombreuses préoccupations, a accepté de prendre la direction de cette thèse, transformant ainsi les difficultés rencontrées en une expérience enrichissante. Je lui suis également reconnaissante pour m'avoir assuré un encadrement rigoureux tout au long de ces années malgré la distance, de diriger mon travail avec beaucoup de disponibilité, de tact et d'intérêt. J'ai particulièrement apprécié sa très grande ouverture face à ma condition de "mère chercheur". Il m'a accueilli au sein de son laboratoire de microbiologie appliquée à l'université de Bejaia, et m'a offert les moyens nécessaires pour effectuer mon travail, ainsi que ses conseils, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je suis aussi redevable à la contribution de monsieur le professeur **OULD EL HADJ Mohamed Didi** qui a co-encadré cette thèse. Il a consacré à sa manière du temps et de l'énergie pour mon avancement. Il m'a accueilli au sein de son laboratoire de protection des écosystèmes en zones aride et semi arides, je le remercie pour ses conseils, son regard, à la fois critique et encourageant sur les différentes étapes de mon travail.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Messieurs et Madame les Professeurs : **OUAHRANI Mohamed Ridha**, **OULD EL HADJ-KHELIL Aminata** et **KECHA Mouloud** d'avoir acceptés d'examiner ce travail, ainsi qu'à M^{me} **SIBOUKEUR Oum El Kheir** pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury.*

*Ma grande reconnaissance à Madame le chef de département de Biologie **Boudjnah Saliha**, à Mme le vice doyen **Pr. Siboukeur Oum El Kheir** et à M^{me} la doyenne de la faculté des sciences biologiques, **Pr. Bissati Samia** de l'université Kasdi Merbah, Ouargla.*

*Je souhaite témoigner toute ma reconnaissance aux Docteurs et collègues **Messis A.** et **Bettache A.** pour leur conseils, mais aussi pour les commentaires judicieux, lesquels m'ont permis de raffiner d'avantage certains points de l'analyse et de l'interprétation de mes données. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon profonde gratitude.*

*Il m'est particulièrement agréable d'adresser mes remerciements très chaleureux et très particulier à mes amis **Soumia** et **Ismahane** pour leur aide morale et leur encouragement.*

*J'adresse également mes remerciements à **Nabila Belhamiche** pour son accueil chaleureux à et sa grande gentillesse durant la réalisation d'une partie de ce travail à l'université de Bejaia au sein du LMA, sans oublier **Karima Boucheffa** et **Daouia**.*

*Je tiens à remercier **M^r Bellaroussi M. H.**, pour son aide à la réalisation des analyses statistiques, pour son temps et sa gentillesse, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements vont également au personnel de laboratoire médical de l'hôpital Slimane Amirat de Touggourt surtout le chef service **M^r Belahcen** et **Messaouda**, et **M^{me} Naiti Saida** pour leur aide ; qu'elle trouve ici mes remerciements les plus chaleureux.*

*Mes remerciements vont à **M^r Kerout Lamine** ex-inspecteur régionale de génie civil, à **Guenoun Katia** de l'université de Tunis, à **M^{elle} Daouaji soumia** de l'université de Ouargla, ainsi à **Amina Benzid** de l'université de Ouargla, pour leur aide qu'ils trouvent ici mes remerciements les plus chaleureux.*

*Un grand merci au responsable de laboratoire de l'université UKMO, et aux ingénieurs des différents laboratoires pour leur serviabilité, leur disponibilité ainsi que leur travail sérieux et sur tout **Chouaiba** et **Imène**.*

*Mes remerciements vont particulièrement à mon regretté père, **Hamdi**, qui m'a élevé avec ce grand goût de dépassement. J'adresse des remerciements de même ordre à ma mère **Naima**, qui m'a constamment encouragée et soutenue tout au long de ces années. Je ne saurai passer sous silence l'apport inestimable des autres membres de ma famille (frères, sœurs, oncles, cousines et cousins, etc.) qui m'ont soutenue, de près ou de loin durant mes études doctorales, ainsi ma deuxième famille **Naiti** surtout ma belle mère **Saada** et à **Tarek** et **Djamila** surtout, que je ne trouve pas les mots pour les remerciers, sans oublier **Abbass**, **Ameur**, **Tayeb**, **Lakhdar**,*

*Les mots me manquent, se disparaître et ne suffit pas, pour remercier, à sa juste valeur, mon conjoint, **Naiti Mouldi**, pour son soutien moral et psychologique indispensable pour maintenir ce projet à flot au travers des aléas de la vie et pour avoir cru en mes capacités intellectuelles et à mon sens de l'organisation pour le réaliser, qu'il trouve ici mes remerciement les plus chaleureux. Je ne saurais terminer sans souligner le soutien amical et chaleureux de mes copines et collègues de tous les jours qui m'ont soutenue durant ce parcours doctoral. Je m'abstiens de les nommer tellement la liste est longue : **Soumia**, **Rokaia**, **Ghania**, **Zineb**, **Mimouni Yamina**, **Wafa siuid**, **Amel**, **Ismahane**, **Soumia Mrabet**, **Farida khelili**, **Amina Siboukeur**, **Khadidja Benzahi**,*

Enfin, il me tenait à cœur de remercier tous les personnes formidables qui ont, chacune à leur façon, et ce, à différentes étapes de mon cheminement, contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de cette thèse de doctorat.

A tous Merci

Bouaziz Sabrina.

Index des figures

Figure 01. Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinobactéries non mobiles monosporulés (Hayakawa <i>et al.</i>, 2004 et Hayakawa, 2008).....	08
Figure 02. Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinobactéries non mobiles dotées d'oligospores (Hayakawa, 2008).....	08
Figure 03. Photographie au microscope électronique d'un isolat d'actinomycète non mobile à sporanges (Ara et Kudo, 2007).....	09
Figure 04. Photographie au microscope électronique d'isolats d'actinomycètes mobiles à sporanges (Hayakawa, 2008).....	09
Figure 05. Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (Conn, 2005).....	16
Figure 06. Inhibiteurs de la synthèse protéique (Lavigne, 2007).....	20
Figure 07. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs (Lavigne, 2007).	20
Figure 08. Mécanisme de résistance aux antibiotiques (Prescott <i>et al.</i>, 2013)	21
Figure 09. Spectres UV-visible d'extraits méthanoliques de mycélium contenant un antifongique de structure polyénique (Bastide <i>et al.</i>, 1986).	25
Figure 10. Structure de la nystatine.....	27
Figure 11. Structure de l'Amphotéricine B.	29
Figure 12. Structure de Griséofulvine.	30
Figure 13. Structure de terbinafine (Lamisil).	31
Figure 14. Situation géographique de la zone de prélèvement.....	34
Figure 14a. Situation géographique de la faculté des sciences de la nature et de la vie..	35
Figure 14b. Situation géographique de la région et Chott de Ain El Beida.....	35
Figure 14c. Situation géographique de la région et de Sabkha de Bamendil.	35
Figure 15. Récapitulatif de protocole d'extraction des antibiotiques à partir de mycélium et de filtrat de culture et semi purification des antibiotiques.	53
Figure 16. Répartition des isolats d'actinobactéries en fonction des traitements utilisés.....	57
Figure 17. Distribution des isolats d'actinobactéries par milieu de culture.....	59
Figure 18. Activité antimicrobienne de la souche ITA1.....	61
Figure 19. Activité antimicrobienne de la souche I4.	61
Figure 20. Activité antimicrobienne de quelques isolats d'actinobactéries sur milieu solide.....	63

Figure 21. Aspect microscopique du mycélium aérien des isolats ITA1 et I4 vu au microscope optique (Optika) au grossissement (×10).	65
Figure 22. Arbre phylogénétique réalisé sur la base de séquences d'ADNr 16S montrant les relations entre les isolats sélectionnés et les différentes espèces de <i>Streptomyces</i>	70
Figure 23. Cinétique de l'évolution du pH, de la croissance et de l'activité de la souche ITA1 sur le milieu Bennett contre <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 et <i>A. ochraceus</i> ATCC NRRL 3174.	74
Figure 24. Cinétique de l'évolution du pH, de la croissance et de l'activité de la souche I4 sur le milieu M2 vis-à-vis <i>A. Niger</i> 2CA936 et <i>A. ochraceus</i> ATCC NRRL 3174.	75
Figure 25. Surface de réponse et parcelles de contour correspondantes de l'activité antibactérienne de la souche <i>Streptomyces sp.</i> I4 en relation avec l'amidon, caseïne et NaCl.....	79
Figure 26. Réponse optimisée, Conception de surface de réponse sélectionnée en utilisant l'optimalité basée sur la distance de I4 sur M2.....	80
Figure 27. Surface de reponse et parcelle de contour correspondante de l'activité antibactérienne de la souche <i>Streptomyces fradiae</i> . ITA1 avec la casaminoacide, l'extrait de levure et l'extrait de viande.....	84
Figure 28. Réponse optimisée, Conception de surface de réponse sélectionnée en utilisant l'optimalité basée sur la distance de ITA1 sur Bennett.....	85
Figure 29. Activité antimicrobienne des extraits organiques du filtrat de culture de la souche ITA1 sur milieu Bennett.....	88
Figure 30. Antibiographie des extraits organiques du filtrat de culture de la souche ITA1 contre <i>A.ochraceus ATCC3174</i> par la méthode des puits.	88
Figure 31. Activité antimicrobienne des extraits organiques du filtrat de culture de la souche I4 sur milieu M2.	89
Figure 32. Chromatogramme des extraits sous lampe UV (254nm) du système B.A.E.M. (n-Butanol-Acide acétique-Eau, 6:1.5:2, v/v/v, modifié).	91
Figure 33. Chromatogramme des extraits organiques de la souche I4 en présence de différents révélateurs.	92
Figure 34. Chromatogramme des extraits organiques de la souche ITA1 en présence de différents révélateurs.	93
Figure 35. Spectre UV-visible d'extrait butanolique brut de l'isolat ITA1	94

Figure 36. Spectre UV-visible d'extrait hexanoïque brut de l'isolat I4.	95
Figure 37. Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (Bergey, 1989).....	Annexe2
Figure 38. Parcelles résiduelles de l'activité antibactérienne de <i>S. fradiae</i> ITA1 sur le milieu Bennett.	Annexe3
Figure 39. Parcelles résiduelles de l'activité antibactérienne de <i>Streptomyces sp.</i> I4 sur le milieu M2.....	Annexe3

Index des tableaux

Tableau I. Habitats de certaines actinobactéries (Grigorova et Norris, 1990).....	07
Tableau II. Chimiotypes rencontrés chez les <i>Actinobacteria</i> (Lechevalier et Lechevalier, 1970)	10
Tableau III. Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les <i>Actinobacteria</i> (Lechevalier et al., 1977)..	11
Tableau IV. Valeur du coefficient de Chargaff pour les différents genres d'actinomycétales (Jacque, 1985).	13
Tableau V. Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy et al., 1987).	18
Tableau VI. Classification des antifongiques selon le mode d'action (Anatoli et Denis, 2006).	23
Tableau VII. Pics d'absorption en UV-visible des polyènes (Martin, 1979).....	25
Tableau VIII. Exemples de molécules antifongiques mises sur le marché classées selon leur mode d'action.	33
Tableau IX. Analyses physico-chimiques et biochimiques des échantillons du sol. (Aubert, 1978).	36
Tableau X. Microorganismes cibles utilisés.	38
Tableau XI. Modèle expérimental de « Box-Behnken » pour le criblage de variables significatives affectant la production d'antibiotique par la souche ITA1 sur le milieu Bennett.	48
Tableau XII. Modèle expérimental de « Box-Behnken » pour le criblage de variables significatives affectant la production d'antibiotique par la souche I4 sur le milieu M2..	49
Tableau XIII. Analyses physico-chimiques des sols de différentes stations d'étude.....	54
Tableau XIV. Isolats d'actinobactéries des différentes stations.	55
Tableau XV. Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries sélectionnés.	59
Tableau XVI. Profils antimicrobiens des isolats d'actinobactéries sélectionnés (Diamètre des zones d'inhibition en mm).	62
Tableau XVII. Caractéristiques macromorphologiques des isolats ITA1 et I4 (7 jours).	65

Tableau XVIII. Analyse des acides aminés et sucres des isolats ITA1 et I4	68
Tableau XIX. Caractéristiques physiologiques des souches ITA1 et I4.	69
Tableau XX. Conception expérimentale et résultats du RSM pour la production d'antibiotique à partir de <i>Streptomyces sp.</i> I4 sur le Milieu M2.....	77
Tableau XXI. Analyse de la variance du modèle quadratique ajusté (Régression de surface de réponse: (Activité antibactérienne d'I4 par rapport à la caséine; Amidon; NaCl).....	78
Tableau XXII. Conception expérimentale et résultats RSM pour la production d'antibiotiques à partir de <i>Streptomyces fradiae</i> ITA1 sur le Milieu Bennett.	82
Tableau XXIII. Analyse de la variance du modèle quadratique ajusté (Régression de surface de réponse:(Activité antibactérienne de d'ITA1 par rapport à la Casaminoacide; E. levure; E. viande).....	83
Tableau XXIV. Classification des Actinobactéries (Goodfellow, 2012).	Annexe
Tableau XXV. Clé d'identification des principaux genres d'Actinobactéries.	Annexe
Tableau XXVI. Analyse statistique des effets de variables (composants de milieu Bennet) de la souche <i>Streptomyces fradiae</i> ITA1 sur l'activité antibactérienne utilisant la conception de Plackett-Burman.	Annexe
Tableau XXVII. Estimations de l'effet de production d'antibiotique à partir du résultat de " Box-Behnken " de <i>Streptomyces fradiae</i> ITA1 sur le milieu Bennet.	Annexe
Tableau XXVIII. Analyse statistique des effets de variables (composants de milieu M2) de la souche <i>Streptomyces sp.</i> I4 sur l'activité antibactérienne utilisant la conception de Plackett-Burman.	Annexe
Tableau XXIX. Estimation de l'effet de production d'antibiotique à partir du résultat de " Box-Behnken " de <i>Streptomyces sp.</i> I4 sur le milieu M2.	Annexe

Productions scientifiques

- **Publication internationale**

- Sabrina Bouaziz, Abdelaziz MESSIS, Azzeddine Bettache, Mohammed Didi Oueld El Hadj, et Said Benallaoua. Antifungal activity of Streptomyces sp.14 strain isolated from Ouargla (Southeast of Algeria): identification, production and characterization of the active substance. International Journal of Biosciences (IJB). Vol. 9, No. 5, p. 45-56, 2016.

- **Communications**

- **Sabrina Bouaziz**, Abdelaziz MESSIS, Azzeddine Bettache, Mohammed Didi Oueld El Hadj, et Said Benallaoua. Activité antimicrobienne d'une souche d'actinobactérie ITA1 isolée de Sud Est d'Algérie, région de Ouargla : isolement, identification et essai de caractérisation du principe actif. 8^{ème} journées scientifiques internationales sur la valorisation des Bioressources les 5, 6 et 7 Mai à Monastir, Tunisie.
- **Sabrina Bouaziz**, Abdelaziz MESSIS, Azzeddine Bettache², Mohammed Didi Oueld El Hadj¹, Et Said Benallaoua. Activité antifongique de Streptomyces sp. I4 isolée de la région de Ouargla, Sud est d'Algérie : identification, cinétique de production et caractérisation du principe actif. Lors de 28^{ème} forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATBS, Tunisie.
- **Sabrina Bouaziz**, Abdelaziz MESSIS, Azzeddine Bettache², Mohammed Didi Oueld El Hadj¹ et Said Benallaoua. Antimicrobial properties of Actinobacteria isolated from Ouargla region (Algeria). First International Congress of Biochemistry & Microbiology Applied Technologies, 3, 4 et 5 novembre 2017 « BMAT'2017 ».
- **Sabrina Bouaziz**, Abdelaziz MESSIS, Azzeddine Bettache, Mohammed Didi Oueld El Hadj, et Said Benallaoua. Criblage et isolement d'Actinobactéries producteurs de substances bioactives à partir de divers écosystèmes de la région de Ouargla. 6^{ème} congrès International de l'ATP-BE, les 18, 20 et 21 Décembre 2017 à Douz, Tunisie.

Liste des abréviations

ADNr	: acide désoxyribonucléique ribosomique
<i>A. flavus</i>	: <i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. niger</i>	: <i>Aspergillus niger</i>
<i>A. fumigatus</i>	: <i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	: <i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. ochraceus</i>	: <i>Aspergillus ochraceus</i>
<i>A. terreus</i>	: <i>Aspergillus terreus</i>
ARNr	: acide ribonucléique ribosomique
ATCC	: American Type Culture Collection
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. neoformans</i>	: <i>Candida neoformans</i>
Ca⁺	: Calcium
CCM	: Chromatographie sur couche mince
Cl⁻	: chlore
DAP	: acide diaminopimélique
DO	: Densité optique
G/g	: gramme
GA	: Milieu Glucose asparagine
GC%	: Pourcentage de Guanine Cytosine
GLM	: Gélose à l'extrait de malt
HCO₃⁻	: Ion hydrogénocarbonate
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IR	: Infrarouge
ISP	: International <i>Streptomyces</i> Project.
ISP4	: Milieu Amidon-sels minéraux-agar
K	: potassium
l	: litre
m	: mètre
<i>M. leprae</i>	: <i>Mycobacterium leprae</i>
M2	: Milieu Williams et Kuster
MA	: Mycélium aérien
Mg	: magnésium
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mn	: minute
MO	: Matière organique
MS	: Mycélium du substrat
N	: azote
NRRL	: Northern Regional Research Center, USA
PCR	: Polymérase chain reaction
pH	: potentiel hydrogène
Rf	: Rapport Frontal
RMN	: Résonance Magnétique Nucleaire
Rpm	: rotation par minute
RSM	: Response Surface Methodology
<i>S.</i>	: <i>Streptomyces</i>
SO₄⁻	: sulfate
UFC	: Unité Formant de Colonie
UV-VIS	: Ultraviolet-Visible.

Remerciements	
Dédicaces	
Index des figures	
Index des tableaux	
Liste des abréviations	
Productions scientifiques	
ملخص	
Résumé	
Abstract	

Table des matières

<i>Introduction</i>	01
---------------------------	-----------

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Actinobactéries	04
1.1. Généralités sur les actinomycètes	04
1.2. Ecologie et distribution des actinobactéries	05
1.3. Taxonomie et critères d'identification	07
1.3.1. Taxonomie Phénotypique	07
1.3.1.1. Critères morphologiques	07
1.3.1.2. Critères chimiques (chimiotaxonomique)	09
Acides aminés pariétaux	09
Sucres cellulaires	09
Les lipides	10
1.3.1.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique	11
1.3.2. Taxonomie moléculaire	11
Séquençage de l'ADN ribosomique 16S	11
Hybridation ADN-ADN	12
Pourcentage de guanine-cytosine (G + C)	12
1.4. Importance des actinobactéries	13
2. Antibiotiques	15

2.1. Généralités.....	15
2.2. Classification et mode d'action.....	16
2.2.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.....	17
2.2.2. Inhibiteurs de la synthèse protéique.....	19
2.2.3. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs.....	19
2.3. Résistance aux antibiotiques.....	20
3. Antifongiques.....	21
3.1. Généralités.....	21
3.2. Classification des antifongiques.....	22
3.2.1. Les antifongiques d'origine naturelle.....	23
3.2.1.1. Les antifongiques polyéniques.....	23
3.2.1.2. Les antifongiques non polyéniques.....	25
3.2.2. Les antifongiques de synthèse.....	26
3.2.3. Principaux antifongiques utilisés en thérapeutique.....	27
3.2.3.1. Origine naturelle.....	27
Nystatine.....	27
Amphotéricine B.....	28
Griséofulvine.....	29
3.2.3.2. Antifongiques de synthèse.....	30
Chlormidazol.....	30
Dérivés azolés.....	30
Allylamines.....	31
3.2.3.3. Les Inhibiteurs de la synthèse pariétale.....	31
Echinocandines.....	31
Nikkomycines.....	32
Polyoxines.....	32

Chapitre II. Matériel et Méthodes

1. Analyses physico-chimiques des échantillons de sol.....	34
---	-----------

1.1. Prélèvements et échantillonnage de sol.....	34
1.2. Méthodes d'analyses.....	36
2. Isolement et sélection de souches d'actinobactéries productrices de substances antimicrobiennes.....	37
2.1. Techniques d'isolement.....	37
2.2. Purification et conservation des souches.....	37
3. Criblage "screening" préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats sélectionnés.....	37
3.1. Microorganismes cibles.....	37
3.2. Standardisation des inocula.....	38
3.3. Tests d'antagonisme.....	38
4. Identification des souches.....	39
4.1. Etude des caractères morphologiques.....	39
4.2. Analyse des constituants pariétaux.....	39
4.2.1. Détermination des acides aminés pariétaux.....	40
4.2.2. Détermination des sucres pariétaux.....	40
4.3. Caractères physiologiques.....	41
Production de pigments mélanoides (mélanine)	41
Production de catalase.....	41
Utilisation de sources de carbone.....	41
Utilisation des composés glucidiques.....	41
Utilisation des acides aminés.....	42
Utilisation des acides gras.....	42
Hydrolyse de la tyrosine.....	42
Hydrolyse de l'amidon.....	42
Hydrolyse de la caséine de lait.....	43
Hydrolyse du tween 80.....	43
Croissance à différents pH et températures.....	43
Croissance en milieu hypersalin.....	43
4.4. Identification moléculaire des isolats sélectionnés.....	43

4.4.1. Extraction de l'ADNr 16S.....	44
4.4.2. Amplification de l'ADNr 16S.....	44
4.4.3. Arbre phylogénétique.....	44
5. Extraction des principes actifs et choix des solvants d'extraction.....	45
5.1. Pré-cultures et Cultures.....	45
5.2. Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques.....	45
5.3. Nouvelle approche pour l'optimisation des paramètres de culture par « Response Surface Methodology –RSM- »	46
5.3.1. Optimisation des composants du milieu de culture par RSM.....	46
5.3.2. Validation du modèle statistique.....	49
5.4. Extraction des principes actifs et choix des solvants d'extraction.....	49
5.4.1. Extraction à partir du mycélium.....	50
5.4.2. Extraction à partir du filtrat de culture : antibiographie et choix des solvants d'extraction.....	50
5.5. Essai de caractérisation partielle des principes actifs.....	50
5.5.1. Chromatographie sur couche mince analytique	50
5.5.2. Bioautographies : Révélation microbiologiques.....	51
5.5.3. Révélation chimiques (réactions chromogéniques) des substances actives.....	52
5.5.4. Spectroscopie UV-VIS.....	52

Chapitre III. Résultats et discussions

1. Analyses physico-chimiques des échantillons de sol.....	54
2. Isolement et sélection de souches d'actinobactéries productrices de substances antimicrobiennes.....	55
3. Criblage "screening" préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats.....	59
4. Taxonomie des souches sélectionnées.....	64
4.1. Caractères morphologiques.....	64
4.2. Analyse des constituants pariétaux.....	66

4.3. Caractères physiologiques.....	68
4.4. Identification moléculaire.....	69
5. Cinétique de croissance et production d'antibiotiques.....	71
6. Optimisation des paramètres de culture pour la production d'antibiotiques par	76
« Response Surface Methodology –RSM- ».....	
Souche I4 dans le milieu M2.....	76
Souche ITA1 dans le milieu Bennett».....	80
7. Extraction, semi-purification et essai de caractérisation des principes actifs des	87
souches sélectionnées.....	
7.1. Extraction des principes actifs et choix du solvant d'extraction de L'isolat	87
ITA1.....	
7.2. Extraction des principes actifs et choix du solvant d'extraction de L'isolat I4.....	89
8. Caractérisation partielle des principes actifs par Chromatographie analytique	90
sur couche mince.....	
8.1. Choix du système de solvant de migration.....	90
8.2. Bioautographie	90
8.3. Réactions chromogéniques des antibiotiques.....	91
8.4. Spectrophotométrie UV-Vis.....	93
Conclusion.....	96
Références bibliographiques.....	100
Annexes	

Introduction

Le sol est un produit écologique largement exploré comme niche pour les microorganismes qui produisent des composés naturels biologiquement actifs (**Ganesh Kumar et al., 2010**). Les actinomycètes constituent un des plus grands groupes de populations microbiennes du sol (**Goodfellow et Williams, 1983**), elles représentent en général 10 à 20% du total de la microflore tellurique (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

Elles représentent une source biologique utile d'antimicrobiens (**Okami et Hotta, 1988**), et une source principale de métabolites secondaires à activité anti-cellulaire (**Finance et al., 1985, Valanarasu et al., 2008**).

Cependant, les actinomycètes sont surtout réputées pour la production d'antibiotiques antibactériens et antifongiques avec près de 70 % des molécules actives commercialisées à leur actif (**Solanki et al., 2008**). Le genre *Streptomyces* est connu comme étant le plus grand producteur d'antibiotiques, soit 80 % des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes (**Demain, 2006**).

En dépit de la longue liste d'antibiotiques actuellement disponibles sur le marché, les antifongiques représentent un faible pourcentage (**Gupte et al., 2002 ; Augustine et al., 2005**). D'après **Berdy et al. (1987)**, près de 40% des antibiotiques synthétisés par l'ensemble des microorganismes possèdent une activité antifongique, mais la gamme des antibactériens est beaucoup plus importante que celles des antifongiques (**Di Domenico, 1999**) car la moitié de ces antifongiques possèdent également des activités antibactériennes (**Berdy et al., 1987**). Ces molécules sont surtout synthétisées par des actinobactéries ou des champignons (**Breton et al., 1989**).

Au cours des deux dernières décennies, la fréquence des infections fongiques a augmenté de façon dramatique en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés tel que les personnes atteintes de cancer, infectées par le virus VIH, ...etc. (**Odds, 1995 ; Ampel, 1996 ; Pfaller, 2002 ; Ascioğlu et al., 2002, Ganesan et al., 2017**). L'apparition de graves pathologies atteignant l'Homme et provoquées par plusieurs espèces de champignons et de levures sont enregistrées. On peut citer les mycotoxicoses provoquées par les genres *Fusarium* et *Aspergillus* (**Nafis et al., 2017**), les mycoallergies provoquées par *Penicillium* et *Mucor* et les mycoses superficielles ou profondes provoquées par *Candida albicans*, *Microsporum*, *Trichophyton* (**Drouhet, 1978**). Les

mycoses se classent à la quatrième position des infections nosocomiales (**Beck-Sagué et Jarvis, 1993**).

Par ailleurs les antifongiques disponibles actuellement en thérapeutique ne rassemblent pas les critères d'un antibiotique idéal (**Lacroix et al., 2003**), c'est pour cela que la recherche de nouveaux antifongiques non toxiques est indispensable.

D'autre part, depuis l'avènement des antibiotiques, la résistance a connu une augmentation considérable cette dernière décennie. Ce phénomène alarmant est d'autant plus problématique particulièrement dans les environnements hospitaliers où des bactéries multi-résistantes apparaissent telles que *Staphylococcus aureus*, mais également l'apparition de nouvelles pathologies et l'évolution des maladies infectieuses (**Demain et Lancini, 2006**). Le marché mondial des antibiotiques est passé de 25 milliards de dollars en 1994 à 31 milliards de dollars en 2003. Durant cette période, l'augmentation la plus significative des ventes a concerné les fluoroquinolones et les macrolides tandis que la part des anti infectieux dans le marché pharmaceutique global a diminué de 1,5% (**Colombié, 2005**).

Parmi les solutions préconisées, une meilleure utilisation des antibiotiques, la réduction de leur consommation et la recherche de nouvelles molécules bioactives (**Strub, 2008**). Ainsi, plusieurs stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces. L'une d'elles vise des souches provenant d'écosystèmes extrêmes et particuliers (**Boubetra et al., 2013 ; Aouiche et al., 2012**). Ainsi, la recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinomycètes est crucial pour la découverte de nouvelles espèces et par conséquent la découverte éventuelle de nouveaux produits naturels bioactifs (**Hozzein et al., 2008 ; Messis et al., 2014**).

Divers écosystèmes à travers le monde ont été explorés pour la recherche de nouvelles espèces d'actinobactéries productrices de nouvelles molécules bioactives : sols salins (**Wen-Jun et al., 2004**), forestiers (**Thakur et al., 2007**), agricoles (**Oskay et al., 2004**) ainsi que les actinomycètes marins (**Gorajana et al., 2010, Saleh Abdelfattah et al., 2016**).

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

2014). Plusieurs études portant sur l'isolement des actinobactéries, la taxonomie des souches isolées et l'étude des antibiotiques secrétés, ont été réalisées.

C'est dans ce contexte que s'intègre la présente étude à savoir l'exploitation des sols de différents écosystèmes sahariens de la région de Ouargla.

L'objectif vise l'isolement d'actinobactéries à partir de différents échantillons de sol, leur identification, ainsi que leur aptitude à produire des substances antimicrobiennes.

Le premier chapitre de ce manuscrit est réservé à une synthèse bibliographique détaillée sur les actinobactéries. Elle porte sur deux aspects, le premier traite les actinobactéries, leurs propriétés taxonomie et importance, le second est un aperçu sur les métabolites secondaires synthétisés par ces actinobactéries.

L'expérimentation est développée sur deux chapitres dont le premier décrit le matériel d'étude et les techniques utilisées et le deuxième relate les résultats et interprétations relatifs aux aspects suivants :

- Isolement des souches d'actinobactéries ;
- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches isolée et sélectionnées
- Identification polyphasique des souches sélectionnées.
- Optimisation des milieux de production des antibiotiques par la méthode des surfaces de réponses (RSM)
- Production et caractérisation partielle des antibiotiques.

*Chapitre I. Synthèse
bibliographique*

1. Actinobactéries

1.1. Généralités sur les actinomycètes

Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un actinomycète en 1875 (Waksman, 1961), puis Harz en 1878 décrivit un organisme parasite rencontré dans une infection de la mâchoire d'un bovin qu'il nomma *Actinomyces bovis* (Theilleux, 1993).

Etymologiquement, le mot actinomycète dérive de mot grec « Aktis » qui veut dire rayon et « mykes » champignon. Les Actinomycètes ont été longtemps considérés comme un groupe intermédiaire entre bactéries et champignons avant d'être reconnus comme des organismes procaryotes (Prescott, 2013).

Les actinomycètes constituent l'ordre des actinomycétales (Mariat et Sebald, 1990) regroupent des genres comme *Streptomyces*, *Frankia*, *Actinomyces* et *Nocardia* qui comprennent des bactéries filamenteuses dont la morphologie ressemble à première vue à celle des moisissures d'où l'appellation d'Actinomycètes. Cependant les filaments des actinomycètes sont en réalité constitués de cellules procaryotes dont le diamètre est beaucoup plus petit que celui des cellules eucaryotes des moisissures (Tortora *et al.*, 2012).

Les actinobactéries mycéliennes constituent un groupe unique de microorganismes procaryotes (Simon et Meunier 1970). Ce sont des bactéries à GRAM positif qui peuvent produire des filaments ramifiés et septés de 0,5-1,0 µm de diamètre (Eunice, 1983), plus petit que celui des champignon et qui peuvent former des spores asexuées (Prescott, 2013). Elles ont un % de G+C élevé (supérieur à 55%), généralement compris entre 60-70% (Goshi *et al.*, 2002). Leur croissance est lente et le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Larpent et Sanglier, 1989 ; Gottlieb, 1973). Ces actinobactéries mycéliennes, cultivées sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien. Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons. Leurs propriétés chimiques, physiologiques, et immunologiques les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine ou de l'acide diaminopimélique et leur cytologie est celle des bactéries (Mariat et Sebald, 1990).

La plupart des actinobactéries sont immobiles. Toutefois certaines produisent des spores flagellées permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques. Ils sont hétérotrophes

(Prescott, 2013), certaines espèces sont chimio-organotrophes, mésophiles et vivent dans la gamme de pH 5,0 à 9,0 avec un optimum vers la neutralité (Williams et Wellington, 1982 ; Goodfellow et Williams, 1983). Elles se séparent en deux groupes physiologiques, le plus important est composé de germes à métabolisme oxydatif habitant surtout le sol ; le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'Homme et des animaux (Leminor et Veron, 1989).

Les actinobactéries sont généralement saprophytes mais quelques uns sont pathogènes pour les plantes tel que *Streptomyces scabies*, agent de la galle de la pomme de terre (Loria, 1986) ou encore pathogènes pour l'Homme comme *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, (Peltola *et al.*, 2001) et pour les animaux tel que *Actinomyces bovis* (Goodfellow et Williams, 1983).

1.2. Ecologie et distribution des actinobactéries

Les actinobactéries sont largement distribuées dans la nature à savoir le sol, l'eau, les plantes (Alexander, 1961 ; You et Park, 1996), l'air, le fumier, le composts, le foin, les débris des végétaux, les résidus fibreux de cannes à sucre, le pollen des plantes, les sédiments marins, les lacs, les rivières, les mers et les océans, ...etc. (Lacey, 1973 ; Cross, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983; Lacey, 1997), ainsi que dans les environnements extrêmes tels que les milieux très salés. Ils sont présents dans les sols glaciaires de l'arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols des régions industrielles polluées par du pétrole ou des métaux lourds, dans les lacs extrêmement alcalins (Lechevalier, 1981). Les actinobactéries sont aussi retrouvées dans les milieux aquatiques : les rivières et les ruisseaux et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4000 m de profondeur (Cross, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983). Généralement neutrophiles, ils peuvent cependant être prédominants dans certains sols très acides (Reed et Drozdowicz, 1978).

Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint 10^6 germes par gramme de sol séché (Goodfellow et Williams, 1983). Le rapport Microorganisme totaux / Actinomycètes diminue avec la profondeur, la couche superficielle contient au moins 80 % de bactéries actinomycétales, alors que la couche située à une profondeur de 80 centimètres ne contient que 40% voire jusqu'à seulement 16 % (Waksman, 1967).

Les actinobactéries sont généralement plus nombreuses que les champignons, mais moins abondantes que les autres bactéries. Elles préfèrent un pH neutre ou peu alcalin

compris entre 7 et 8 (**Hagedorn, 1976**), elles sont généralement mésophiles, certaines sont thermophiles (**Goodfellow et Williams 1983**) tel que *Thermoactinomyces* (**Lacey et Cross, 1989**) tolérants des températures avoisinant 50°C voire 60°C. Elles sont aérobies strict à l'exception de certaines espèces anaérobies facultatives (*Oerskovia*), ou microaérophiles (*Actinomyces* et *Agromyces*) (**Lechevalier, 1981**),

La majorité des actinomycètes vivent dans des conditions d'humidité peu élevées de l'ordre de 5 à 25%, et elles peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau (aw) est très basse (**Davies et Williams, 1970 ; Goodfellow et Williams, 1983, Lacey et Cross, 1989**).

Les sols sahariens sont caractérisés par une faible humidité avec un degré de pluviométrie souvent inférieur à 100 mm par an, des températures extrêmement élevées et de faibles quantités d'humus. Les sols désertiques ne sont pas stériles, ils sont peuplés d'une flore microbienne très variée (**Killian et Feher, 1939**). Parmi les bactéries isolées, les actinobactéries représentent une microflore essentielle, leur présence est importante dans ce type d'écosystème extrême (**Killian et Feher, 1939**).

La plupart des actinobactéries sont saprophytes et sont aptes à dégrader la matière organique non biodégradables par les champignons et les bactéries (**Crawford et al., 1993**) sous forme polymérique (kératine, cellulose, lignine) et à produire des substances probiotiques et antibiotiques (**Kieser et al., 2000**). Certaines d'entre elles sont pathogènes ou encore symbiotiques des plantes ou des animaux (**Williams et al., 1984; Locci, 1994; Suzuki et al., 1994; Peltola et al., 2001**). Elles peuvent coloniser la rhizosphère des plantes et jouer un rôle dans la promotion de leur croissance et contribuent à leur protection contre les agents nocifs (**El-Tarabily et al., 2009; Qin et al., 2009; Khamna et al., 2010**). Les actinobactéries sont fréquemment bactériolytiques grâce à des enzymes hydrolytiques capables de fragmenter les peptides de la paroi, leurs propriétés anti microbienne sont aussi bien connues et un bon nombre d'antibiotiques sont produits lors de leur croissance. L'équipement enzymatique des actinomycètes est très diversifié, il est à l'origine du rôle écologique majeur de ces organismes (**Boudemagh, 2005**).

Tableau I. Habitats de certaines actinobactéries (Grigorova et Norris, 1990).

Actinomycètes	Habitats
<i>Actinoplanes</i>	eau douce, litière végétale, sol.
<i>Frankia</i>	nodules racinaires des non-légumineuses.
<i>Micromonospora</i>	eau douce, sédiments, sols humides.
<i>Nocardia amarae</i>	boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	déjections animales, eau, sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin.
<i>Streptomyces</i>	sol, litière végétale, eau.
<i>Thermoactinomyces</i>	compost.

1.3. Taxonomie et critères d'identification

Les actinomycètes sont classés dans le domaine Bactéria et phylum des Actinobacteria selon le **Bergey's manual, (2012)**, ce dernier (phylum) est subdivisé en 06 classes dont celle de Actinobacteria. Celle-ci se divise en 15 ordres. Les plus importants sont ceux des Actinomycetales et Streptomycetales (**Goodfellow et al., 2012**).

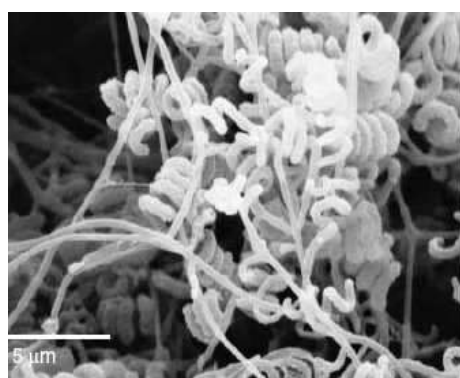
La taxonomie actuelle des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. La plupart des genres peuvent être définis par des critères morphologiques et chimiques, tandis que la détermination des espèces repose sur les critères physiologiques et moléculaires.

1.3. 1. Taxonomie phénotypique

1.3.1.1. Critères morphologiques

Les caractères macromorphologiques et culturels des actinobactéries sont déterminés sur différents milieux de culture, ils contribuent dans la différenciation des genres d'actinobactéries. Il s'agit d'observer à l'œil nu la production ou non du mycélium aérien (MA) et la présence ou non de mycélium du substrat (MS) ainsi que la production ou non de pigments mélanoides. Les couleurs du mycélium aérien, du mycélium de substrat ainsi que la production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture sont obtenus à l'aide d'une charte de couleur (**Kelly et Judd, 1976**).

La détermination des caractères micromorphologiques se fait par l'observation directe au microscope optique ou électronique des cultures poussant sur des milieux gélosés (Tresner *et al.*, 1961; Holt *et al.*, 1994). Les observations portent sur les mycéliums aériens et du substrat. Il s'agit d'observer la présence ou non de sporophores sur le mycélium, la présence ou non de sporanges, de sclérotés ou de synnemata tel que *Actinosynnema*, la présence de spores mobiles tel que *Planomonospora*, *Actinoplanes*, ou non mobiles tel que *Streptomyces*, *Streptosporangium*, leur forme, leur disposition sur les hyphes et leurs nombres (Figure 01, 02, 03 et 04).

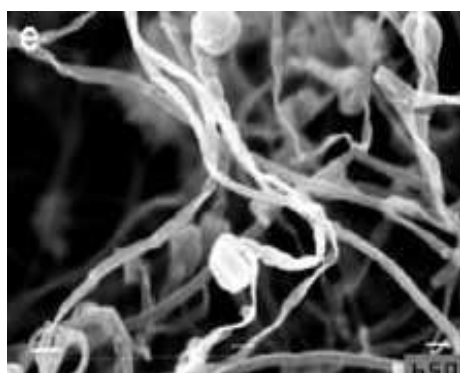


Streptomyces violaceusniger

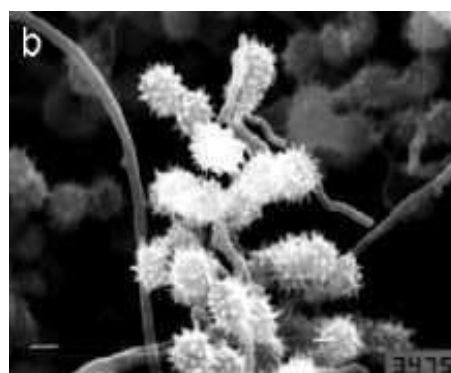


Micromonospora sp.

Figure 01. Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinobactéries non mobiles monosporulés (Hayakawa *et al.*, 2004 et Hayakawa, 2008)



Nonomuraea sp.



Actinomadura spp.

Figure 02. Photographies au microscope électronique d'isolats d'actinobactéries non mobiles dotées d'oligospores (Hayakawa, 2008)

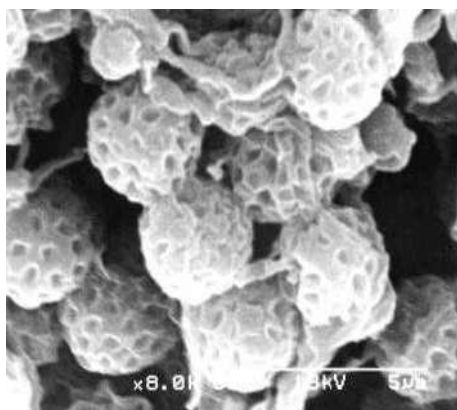


Figure 03. Photographie au microscope électronique d'un isolat d'actinobactérie non mobile à sporanges (Ara et Kudo, 2007).



Figure 04. Photographie au microscope électronique d'isolat d'actinobactérie mobile à sporange (Hayakawa, 2008).

1.3.1.2. Critères chimiques (chimiotaxonomique)

Si les caractères morphologiques peuvent être suffisants pour la détermination de certains genres, la grande majorité nécessite une étude chimique ou chimiotaxonomique des constituants de leur paroi cellulaire. **Becker et al. (1965)** ; **Yamaguchi (1965)** et **Lechevalier et Lechevalier (1970 a et b)** ont pu fournir des méthodes pratiques afin de différencier les genres d'actinobactéries et divisèrent les actinomycètes en chimiotypes sur la base de l'analyse de la composition cellulaire en acides aminés pariétaux, en glucides cellulaires, en phospholipides membranaires, en ménaquinones, en acides gras membranaires et en acides mycoliques pariétaux.

Acides aminés pariétaux

L'une des propriétés importantes dans la taxonomie des actinobactéries est la présence de deux acides aminés dans la paroi cellulaire, il s'agit de l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous formes isomériques LL ou DL (*méso*) et la glycine qui est variablement présente. Chez quelques actinobactéries, le DAP peut être remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique (**Becker et al., 1965**).

Sucres cellulaires

Les sucres caractéristiques sont principalement les couples arabinose-galactose, arabinose-xylose, rhamnose-galactose, ainsi que le madurose ou 3-O méthyl galactose

(Lechevalier et Lechevalier, 1970b). Sur la base de la composition des cellules en acides aminés et en sucres, plusieurs chimiotypes ont été définis (**tableau II**).

Tableau II. Chimiotypes rencontrés chez les Actinobacteria
(Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Chimiotype	Caractéristiques	Exemples de genre
I C	LL DAP + glycine (pas de sucres taxonomiquement importants)	Streptomyces.
II D	DL DAP + glycine + arabinose + xylose	Micromonospora, Actinoplanes.
III B	DL DAP + madurose	Actinomadura, Streptosporangium
III C	DL DAP (pas de sucres caractéristiques)	Nocardiopsis
III E	DL DAP + rhamnose + galactose	Saccharothrix.
IV A	DL DAP + arabinose + galactose	Nocardia, Amycolatopsis.
V	Ornithine + lysine	Actinomyces.
VI	Lysine	Oerskovia
VII	Acide diaminobutyrique et glycine (lysine variablement présente)	Agromyces
VIII	Ornithine	Cellulomonas.

Lipides

L'analyse des lipides cellulaire pariétaux et membranaires est un outil important dans la classification des actinobactéries dont les phospholipides, les ménaquinones, les acides gras et les acides mycoliques ; ces derniers étant des lipides complexes insaturés. L'analyse des phospholipides a permis de distinguer cinq profils phospholipidiques notés de PI à PV caractérisés par la présence d'un ou deux phospholipides caractéristiques (Lechevalier *et al.*, 1977) (**tableau III**).

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

Types de phospholipides	PE	PC	PG	PGI	Exemples
PI	-	-	-	V	Actinomadura.
PII	+	-	-	-	Streptomyces, Pseudonocardia.
PIII	-	+	-	V	Nocardiopsis, Amycolatopsis.
PIV	+	-	+	-	Nocardia, Nonomuraea.
PV	-	-	+	+	Oerskovia.

PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, PG : phospholipides contenant de la glucosamine, PGI : phosphatidylglycérol. + : présent; - : absent ; v : variable selon les genres et les espèces. Le Phosphatidylinositol PI est présent chez toutes les actinobactéries.

1.3.1.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique

Pour la détermination des espèces, il est important d'utiliser des tests physiologiques de type de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques, protéiques, polymères complexes, stéroïdes, etc., des tests de tolérance à différents agents physiques (température et pH) et chimiques (chlorure de sodium, phénol, lysozyme, antibiotiques, ...etc.).

La taxonomie numérique a aussi apporté plus de clarté dans la reconnaissance, auparavant très confuse des espèces. **Goodfellow (1971)** fut l'un des premiers à avoir appliqué cette analyse aux actinomycètes. Mais vu le nombre important de tests à effectuer, cette méthode est très peu utilisée surtout depuis l'avènement des critères moléculaires.

1.3.2. Taxonomie moléculaire

Dès l'avènement de la biologie moléculaire vers le début des années 1980, les méthodes traditionnelles de classification ont commencé à être remplacées par les techniques moléculaires qui reposent sur les analyses des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN et la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%) pour déterminer la position taxonomique des actinobactéries (**Stackebrandt *et al.*, 1981**).

Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Le premier à avoir utilisé cette technique pour la taxonomie des actinobactéries a été **Stackebrandt** et ses collaborateurs en **1981** et **1983**. Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un gène chromosomique d'une taille de 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.

L'étude de l'ADNr 16S utilise deux techniques de base la PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage. Le gène ADNr est amplifié par PCR, puis les séquences du produit sont analysées. Les séquences ainsi obtenues des différents taxons sont comparées entre elles ou bien avec des espèces de références répertoriées dans des banques de données génomiques (**Rainey et al., 1996 ; Labeda et Kroppenstedt, 2000**) accessibles sur internet telles que « Ez Taxon ». Ainsi, le séquençage de l'ADNr 16S constitue un outil très rapide pour l'identification des taxa. Le positionnement taxonomique des souches étudiées par rapport aux genres et aux espèces voisines (phylogénie) utilise des méthodes de calcul des distances d'évolution. Il est admis que deux genres ayant une homologie inférieure à 94% sont différents, il en est de même pour deux espèces présentant une homologie inférieure à 97% (**Devereux et al., 1990; Stackebrandt et Goebel, 1994**). Il faut cependant noter qu'un taux d'homologie compris entre 97% et 100% n'indique pas nécessairement que les espèces sont identiques, surtout si cette dernière fait partie d'un genre comptant un grand nombre d'espèces comme c'est le cas pour le genre *Streptomyces*. Le recours à l'hybridation ADN-ADN s'avère donc nécessaire pour statuer définitivement sur des cas pareils. Dans ce contexte, **Meier-Kolthoff et al. (2013)** et **Kim et al. (2014)**, ont proposé 98,2% et 98,65%, respectivement comme une limite de séparation entre les espèces et ce sans avoir recours à l'hybridation ADN-ADN.

Hybridation ADN-ADN

L'analyse de l'hybridation ADN-ADN est indispensable pour l'identification définitive d'une espèce lorsque les séquences de l'ADNr 16S présentent des similarités supérieures au pourcentage du seuil de la détermination d'espèce nouvelle. L'hybridation ADN-ADN consiste à estimer le taux de réassociation (hybridation) de l'ADN génomique d'un taxon avec celui des espèces les plus proches. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance de l'ADN génomique inférieur à 70% (**Wayne et al., 1987 ; Devereux et al., 1990**).

Pourcentage de guanine-cytosine (G + C)

En 1949 **Chargaff et al.**, signalent que le contenu en bases puriques et pyrimidiques de l'ADN pouvait varier d'un individu à l'autre mais était constant pour les individus d'une même espèce. Chez les bactéries le pourcentage G+C varie de 25 à 75%. Pour les actinobactéries, ce coefficient est supérieur à 55%, il est généralement compris entre 60 à 78% (**Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997 ; Stackebrandt et al., 1997 ; Euzéby, 2002**). Le **Tableau IV**, représente les valeurs de GC des actinobactéries. La

détermination du coefficient de Chargaff (G+C%) est un critère important non seulement dans l'identification des genres mais aussi des familles d'actinobactéries. Ceci a permis de différencier la lignée des actinobactéries de celle des autres bactéries. De même, d'autres bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus*, sont considérées comme faisant partie de la lignée phylogénique des actinobactéries (Goodfellow, 1985 et 1989).

Tableau IV. Valeur du coefficient de Chargaff des différents genres d'actinomycétales (Jacque, 1985).

Genre	CG%
<i>Mycobacterium</i>	64 à 70
<i>Actinomyces</i>	63 à 73
<i>Nocardia</i>	67 à 69,4
<i>Streptomyces</i>	69 à 76
<i>Micromonospora</i>	71,4 à 72,8
<i>Actinoplanes</i>	70,6 à 76

1.4. Importance des actinobactéries

Les actinobactéries par leurs propriétés et leur diversité écologique dans les différents écosystèmes ont fourni un nombre considérable de composés bioactifs de haute valeur commerciale. Elles sont recherchées de façon routinière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives utilisées dans différents domaines industriels, biotechnologies, pharmaceutiques et alimentaires (Vijayakumar *et al.*, 2007).

Les actinobactéries contribuent significativement dans la dégradation de polymères complexes tels que : la lignocellulose, l'hemicellulose, les pectines et la chitine (Abou-Elela et Ghanem, 2005 ; Pizzul, 2006 ; Vijayakumar *et al.*, 2007). Elles jouent un rôle majeur dans le recyclage de la matière organique, les interactions avec les plantes et dans l'écosystème du sol en général (Hirsch et Christensen, 1983 ; Conn, 2005).

Dans les domaines pharmaceutiques, médical et vétérinaires, les actinobactéries produisent de nombreuses molécules à activité antitumorale tel que l'antramycine, des insecticides, des acaricides tel que l'altémicidine, ...etc. (Vandamme, 1985). Cependant ce sont les antibiotiques qui occupent une place importante dans l'arsenal thérapeutique et commerciale (Lacey, 1973 ; McCarthy et Williams, 1990 ; Ouhdouch *et al.*, 2001;

Saadoun et Gharaibeh, 2003; Oskay *et al.*, 2004). Plus de 70% des molécules actives d'origine actinomycetale sont synthétisées par le genre *Streptomyces* (Eckwall et Schottel, 1997), dont différentes familles chimiques telles que aminoglycosides, anthracyclines, chloramphénicol, β - lactames, macrolides et tétracyclines (Wijitra *et al.* , 2006). Plus de 60% des substances médicamenteuses utilisées en chimiothérapie cancéreuse dérivent de composés naturels et la plupart proviennent d'actinobactéries, tels que l'actinomycine D (Demain et Lancini, 2006 ; Anibou *et al.*, 2008).

Dans le domaine agronomique, grâce à leur capacité de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, etc., les actinobactéries jouent un rôle important dans la fertilisation des sols (Lechevalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983 ; Lacey, 1997 ; Zaitlin et Watson, 2006 ; Pizzul, 2006). Ils sont aussi capables de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par des champignons toxigènes et réduire ainsi leur teneur dans les produits agro-alimentaires (Holzapfel *et al.*, 2002). Leur grand pouvoir antagoniste leur confère également un rôle dans la distribution écologique des microorganismes (Dommergues et Manganot, 1970) et dans la lutte biologique contre les agents phytopathogènes telluriques (Goodfellow et Williams, 1983).

Les antibiotiques synthétisés par les actinobactéries et commercialisés trouvent également une application dans les élevages industriels d'animaux (Khachatourians, 1998) ; Ils sont utilisés non seulement pour prévenir les maladies des animaux, mais aussi dans l'alimentation pour accroître les rendements en zootechniques (Tomita *et al.*, 1990 ; Khachatourians, 1998 et Schwarz *et al.*, 2001).

Certains antibiotiques produits par les actinobactéries sont parfois utilisés dans la lutte chimique contre les maladies des plantes d'origine microbienne, comme c'est le cas pour la kasugamycine, la blasticidine et les polyoxines. Ces dernières sont utilisées à grande échelle depuis longtemps au Japon contre certaines maladies du riz (Misato, 1982). Les actinobactéries ont aussi l'avantage d'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire et sont capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes (El-Shatoury *et al.*, 2004) ; ainsi la capacité de dégradation de composés hydrophobes et leur activité est due soit à la production de biosurfactants extracellulaires, particulièrement des glycolipides tels que le tréhalose, soit

par la production de biosurfactants cellulaires tels que les acides mycoliques (**Pizzul, 2006**). Les actinobactéries, dans les habitats naturels tels que les forêts ; interagissent de différentes manières avec les plantes supérieures (**Li et al., 2002**). Il a été démontré que les actinobactéries vivent en association dans la rhizosphère, avec de nombreuses plantes, notamment les cultures de céréales telles que le blé (**Coombs et Franco, 2003**). Le genre *Frankia* est également très important pour un bon nombre de plantes, provoquant des nodulations aux racines permettant ainsi la fixation de l'azote par la plante hôte (**Zaitlin et Watson, 2006 ; Lechevalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983**).

Dans les domaines industriels, les actinobactéries sont utilisées pour la production de plusieurs substances à forte valeur ajoutées parmi lesquelles il faut citer : les vitamines (**Piret et Demain, 1988**), des additifs alimentaires (**Oestergaard et Sjoeholm, 2001**), Les enzymes (**Young et al., 1980 ; Oskay et al., 2004**),

Des enzymes telles que les cellulases et les xylanases utilisées en papeteries et dans le traitement des effluents sont synthétisées par des actinobactéries (**Basilio et al., 2003 et Oskay et al., 2004**).

Elles peuvent aussi produire des hormones, des vasodilatateurs, des inhibiteurs enzymatiques, des substances anti-cholestérolémiques, des analgésiques, des immunosuppresseurs, des hypoglycémisants, toxines ...etc. (**Asselineau et Zalta, 1973 ; Deshpande et al., 1988 ; Ohmori et al., 1988 ; Umezawa, 1988 ; Papp et al., 1992 ; Tsuboya et al., 1996 ; Kim et al., 1998 ; Murakata et al., 1998 ; Eder et al., 2002 ; Dairi, 2005 et Pizzul, 2006**), elles interviennent également dans la bioconversion des stéroïdes (**Sallam et al., 1995**) (**Figure 05**).

2. Antibiotiques

2.1. Généralités

Le mot antibiotique fut utilisé la première fois en **1942** par **Waksman** et le défini comme étant : une substance chimiquement finie, produite par des microorganismes et qui a la propriété d'inhiber la croissance ou même de détruire des bactéries ou certains microorganismes en solution diluée *in vitro* ou *in vivo* » (**Simon et Meunier, 1970**).

A l'origine, le mot antibiotique désigne tout produit microbien qui, même à très faibles concentrations, inhibe ou tue certains microorganismes. Maintenant il est élargi pour

inclure en outre toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de ces propriétés (Singleton, 1994).

Les actinobactéries occupent la première place comme fournisseurs de substances bioactives dont 45% de ces molécules sont d'origine microbienne, soit environ 10 100 composés (Berdy, 2005 ; Solecka *et al.*, 2012).

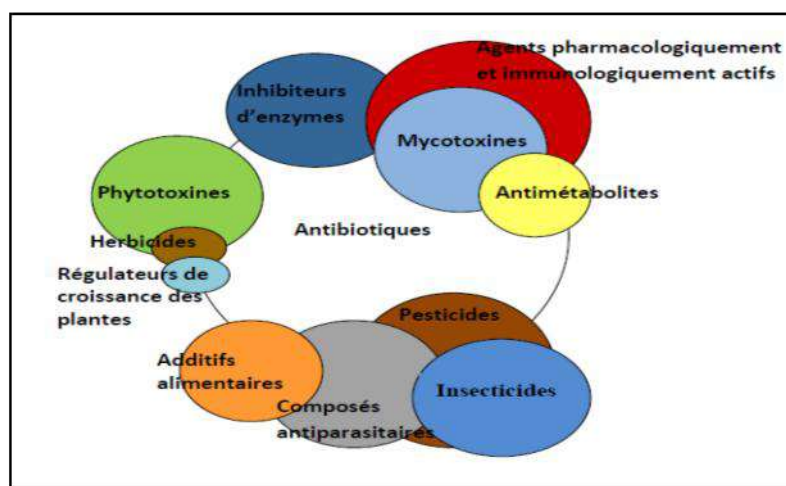


Figure 05. Métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes (Conn, 2005).

Parmi les substances bioactives, les antibiotiques sont les molécules les plus importantes et 40% de ces dernières possèdent des activités antifongiques. (Lacey, 1973 ; McCarthy et Williams, 1990 ; Ouhdouch *et al.*, 2001 ; Saadoun et Gharaibeh, 2003 ; Oskay *et al.*, 2004). Le genre *Streptomyces* est la source la plus importante de ces antibiotiques (Okami et Hotta, 1988 ; Long et Wildman, 1993 ; Sanchez et Barana, 1996 ; Hwang *et al.*, 2001 ; Saadoun et Gharaibeh, 2003 ; Oskay, 2004 ; Anansiriwattana *et al.*, 2006), il produit à lui seul plus de 7 600 composés bioactifs soit environ 36% de toutes les molécules d'origine microbienne et 80% de toutes les molécules d'origine actinobactérienne (Thakur *et al.*, 2007 ; Solecka *et al.*, 2012) .

2.2. Classification et mode d'action

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur nature chimique, leur mécanisme d'action et leur spectre d'action (Walsh, 2000). La classification la plus utilisée est celle basée sur la structure chimique (Berdy *et al.*, 1987 ; Bycroft, 1988). La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification. Près de 7000 molécules ont été classées dans 9 grandes familles et de nombreuses sous-familles chimiques

(**tableau V**). Les actinobactéries produisent une gamme diverse d'antibiotiques comprenant des aminoglycosides, des anthracyclines, des glycopeptides, des β -lactamines, des macrolides, des nucléosides, des peptides, des polyènes, des polyéthers et des tétracyclines (**Sahin et Ugur, 2003**).

Le mode d'action d'un antibiotique est en relation avec sa structure chimique. En général, à chaque classe d'antibiotique est associée un site d'action dans la cellule microbienne.

Selon la famille d'antibiotiques concernée, le mécanisme d'action consistera soit à :

- ❖ inhiber la synthèse du peptidoglycane, matériau de base de la paroi bactérienne : β -lactamines, pénicillines, céphalosporine, fosfomycine et vancomycine ;
- ❖ inhiber la synthèse des protéines bactériennes : aminoglycosides, macrolides et apparentés, phénicolés et tétracyclines ;
- ❖ inhiber directement ou indirectement la synthèse des acides nucléiques : quinolones, sulfamides, ... etc. (**Prescott et al., 2013**).

2.2.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à GRAM positif et à Gram négatif. La synthèse de la paroi bactérienne comporte trois étapes successives : la première dans le cytoplasme consiste en la formation des unités de base de l'UDP-N-acétyl-glucosamine et l'UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide. La deuxième étape permet le passage par un système de transporteurs lipidiques à travers la membrane cytoplasmique de ces deux précurseurs et leur addition pour former une molécule de disaccharide-pentapeptide. Au cours de la troisième étape, cette molécule s'intègre au peptidoglycane pré-existant. A ce stade, deux enzymes essentielles interviennent : une transglycosylase qui permet l'attachement des disaccharides-pentapeptides entre elles aboutissant à la formation des chaînes polysaccharidiques et une transpeptidase qui réticule les chaînes entre elles par formation d'une liaison peptidique entre l'alanine-4 d'un disaccharide pentapeptide et le peptide d'une chaîne voisine. Chacune de ces trois étapes peut être perturbée par l'action des antibiotiques. Par exemple, les β -lactames inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (**Smaoui, 2010 ; Prescott et al., 2013**), la vancomycine est une molécule composée d'une partie peptidique liée à un disaccharide. La

partie peptidique de l'antibiotique bloque la synthèse du peptidoglycane lors de l'étape de transpeptidation en se liant spécifiquement à la séquence terminale D-alanine-D-alanine du pentapeptide du peptidoglycane. Il a un effet bactéricide (**Prescott *et al.*, 2013**).

Tableau V. Classification des antibiotiques selon leur structure chimique
(**Berdy *et al.*, 1987**)

Familles d'antibiotiques	Sous-familles	Exemples
1-Glucide et apparentés	-Glucides purs	Nojirimycine
	-Aminoglycosides	Streptomycine, gentamicine, kanamicine.
	-Glycosides	C-Glycosides : vancomycine. N-Glycosides : striptothricine
	-Glycolipides	Moenomycine.
2-Lactones macrocycliques	-Macrolides	Stiramicine, érythromicine.
	-Polyènes	Amphotéricine, nystatine, candicidine
	-Macrotétrolidés	Teranactine, nonactine
	- Macro lactames	Rifamycine
3-Quinones et apparentes	-Polycycliques accolés linéairement	Tétracyclines
	-Dérivés naphoquinoniques	Anthracyclines
	-Dérivés benzoquinoniques	Mitomycine
4-Acide aminés et peptides	-Dérivés d'acides aminés	Cyclosérine, pénicilline, nocardicine
	-Homopeptides	Bacitracine, cyclosporine
	-Hétéropeptides	Aculé acine
	-Depsipeptides	Valinomycine
5-Hétérocycles à azote	-Hétérocycles non accolés	Aerulomycine, mildiomycine
	- Hétérocycles accolés	Phénazines, herbicidine
6- Hétérocycles à oxygène	-Polyéthers	Monensine, nigérocine
7-Composés alicycliques	-Dérivés cycloalcane	Cycloheximide
	-Terpènes	Acide marasmique.
	-Oligoterpènes	Acide fusidique.
8-Aromatiques	-Dérivés benzéniques	Chloramphénicol.
	-Composés non benzéniques	Griséofulvine.
	-Aromatiques accolés	Fusariocine.
	-Autres dérivés aromatique	Novobiocine.
9-Aliphatiques	-Dérivés des alcanes	Elaiomycine
	-Dérivés d'acides carboxyliques	Céruléine
	-Composés contenant du phosphore ou du soufre	Fosfomycine.

2.2.2. Inhibiteurs de la synthèse protéique

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse protéique en se fixant sur le ribosome et d'autres composants de cette synthèse, d'où plusieurs étapes de cette dernière peuvent être affectées : la fixation de l'aminoacyl-ARN, la formation de la liaison peptidique, la lecture de l'ARNm et translocation (**Prescott *et al.*, 2013**). Dans catégorie d'inhibiteur on peut citer :

❖ **Macrolides** : Liaison de façon réversible à la sous unité 50S des ribosomes (site P) inhibant la transpeptidation et la translocation, ils ont un effet bactériostatique (**Lavigne, 2007**), l'exemple de l'érythromycine qui se fixe sur la l'ARNr 23S de la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique pendant la synthèse protéique (**Prescott *et al.*, 2013**).

❖ **Aminoglycosides** : Ils se fixent sur la sous unité 30S du ribosome et interfère avec la synthèse protéique (**Prescott *et al.*, 2013**) et cela par l'inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique et en bloquant le complexe d'initiation (**Lavigne, 2007**), ils ont un effet bactéricide.

❖ **Chloramphénicol** : il se fixe à l'ARNr 23S sur la sous unité 50S (au site A) du ribosome et inhibe la peptidyltransferase (**Prescott *et al.*, 2013**), ils ont un effet bactériostatique.

❖ **Tétracyclines** : Ils inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous unité 30S du ribosome et ils inhibent la fixation des molécules d'aminoacyl-ARNt sur le site A du ribosome, ils ont une action bactériostatique (**Lavigne, 2007 ; Prescott *et al.*, 2013**).

2.2.3. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs

Les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques visent soit l'ADN polymérase et l'ADN hélicase ou l'ARN polymérase et bloquent de ce fait respectivement la réplication ou la transcription (**Prescott *et al.*, 2013**).

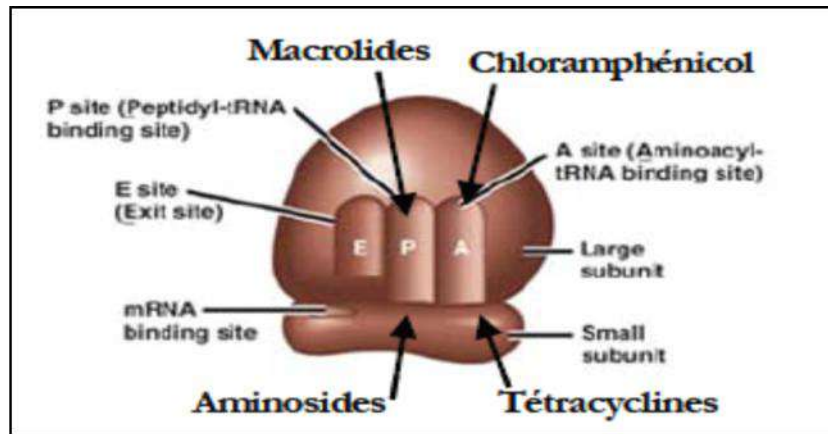


Figure 06. Inhibiteurs de la synthèse protéique (Lavigne, 2007).

❖ **Quinolones et fluoroquinolones** : les quinolones inhibent spécifiquement l'activité ligase en se fixant sur la sous-unité A de l'ADN gyrase (Inhibition de la réplication de l'ADN) (Bustany et Chaumet-Riffaud, 1993).

❖ **Rifampicine** : bloque la transcription par la liaison à la sous-unité β de l'ARN-polymérase. Elle a un effet bactéricide (Lavigne, 2007).

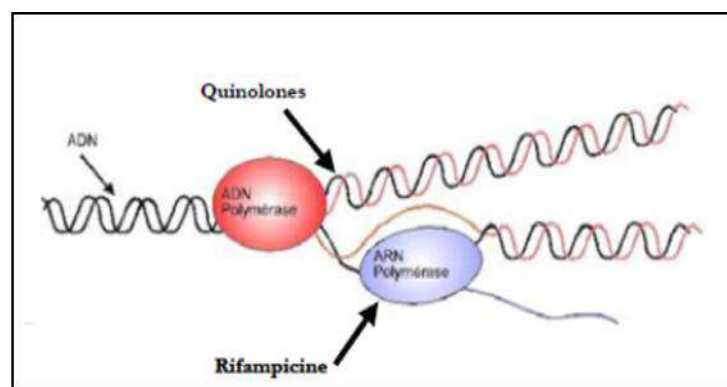


Figure 07. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs (Lavigne, 2007).

2.3. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries, au fil du temps, ont développé des moyens pour éviter l'action des antibiotiques pour pouvoir résister à des concentrations en antibiotiques significativement plus élevées que celles habituellement actives sur les souches de cette espèce.

Il faut distinguer la résistance innée ou naturelle, de la résistance acquise apparaissant chez des bactéries sensibles aux antibiotiques. Celle-ci correspond à une adaptation des bactéries

aux antibiotiques qui est due soit à des mutations soit à la présence de nouveaux gènes portés par des plasmides ou des transposons. La résistance par mutation chromosomique ne concerne qu'un faible pourcentage des souches isolées en clinique. Découverte à la fin des années 50, au Japon à la suite d'une épidémie de dysenterie bacillaire, la résistance d'origine plasmidique est beaucoup plus fréquente (Prescott *et al.*, 2013). Les bactéries peuvent devenir résistantes à un antibiotique en l'empêchant d'entrer dans la cellule, en l'expulsant de la cellule, en l'altérant à l'aide d'une enzyme, en modifiant l'enzyme ou l'organe cible pour le rendre moins sensible. Les gènes résistant aux antibiotiques peuvent être présents sur le chromosome bactérien, sur un plasmide, appelé plasmide R, ou sur d'autres éléments génétiques comme les transposons (figure 08) (Prescott *et al.*, 2013).

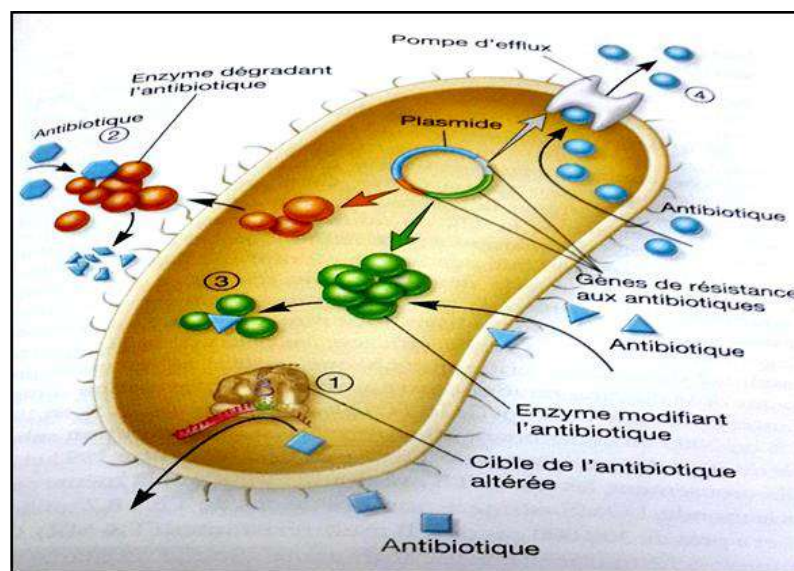


Figure 08. Mécanisme de résistance aux antibiotiques.

Les bactéries résistent à l'action des antibiotiques (1) en empêchant l'antibiotique d'atteindre (altérant) la cible, (2) en dégradant l'antibiotique, (3) en modifiant l'antibiotique, ou (4) en rejetant rapidement l'antibiotique (Prescott *et al.*, 2013).

3. Antifongiques

3.1. Généralités

Au cours de ces dernières années, les mycoses ont augmenté d'une façon sévère et se classent à la quatrième position des infections nosocomiales (Beck-Sagué et Jarvis, 1993, Carle, 2003). Cela est dû à l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, comme les cancéreux, les personnes infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les

personnes ayant subi une greffe d'organes solides (**Cheraiti et Gacemkirane, 2012**). De graves pathologies atteignant l'Homme et provoquées par plusieurs espèces de champignons et de levures sont enregistrées. Parmi elles on peut citer les mycotoxicoses provoquées par des espèces des genres *Fusarium* et *Aspergillus* (**Drouhet, 1978**). Ces derniers dont *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* et *A. terreus* sont responsables de la plupart des mycoses invasives et de près de 90 % des mycoses humaines. (**Carle, 2003 ; Couturaud, 2004**). Certaines mycoallergies sont provoquées par des espèces des genres *Penicillium* et *Mucor* et des mycoses superficielles ou profondes sont causées par *Candida albicans*, *Microsporium*, *Trichophyton* (**Drouhet, 1978**).

Des agents chimiques tels que l'iodure de potassium, les sels de métaux lourds, des métalloïdes, des dérivés soufrés et phénoliques, des colorants... sont utilisés pour traiter certaines mycoses superficielles (**Hamoir et al., 2001**).

Au début du 20^{ème} siècle, sont découvertes puis développées des molécules destinées à lutter contre les champignons parasites de l'Homme et des animaux. Actuellement des études s'orientent vers la recherche et l'utilisation des biomolécules obtenues à partir des microorganismes qui ont des activités antimicrobiennes.

Les antifongiques représentent près de 40% des antibiotiques synthétisés par l'ensemble des microorganismes (**Berdy et al., 1987**). La gamme des antibactériens est donc beaucoup plus importante que celles des antifongiques (**Di Domenico, 1999**) et plus de la moitié de ces antifongiques possèdent également des activités antibactériennes (**Berdy et al., 1987**). Ces molécules sont surtout synthétisées par des actinobactéries ou des champignons (**Breton et al., 1989**). Les antifongiques disponibles actuellement en thérapeutique n'assemblent pas les critères d'un antibiotique idéal (**Lacroix et al., 2003**). C'est pour cette raison qu'il est indispensable de s'orienter vers la recherche de nouveaux antifongiques non toxiques. Les actinobactéries représentent une source biologique majeure d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes, et environ 70% des molécules actives d'origine microbienne, notamment les antibiotiques, sont produits par ce groupe de microorganismes (**Okami et Hotta, 1988**).

3.2. Classification des antifongiques

Les antifongiques sont classés en fonction de la structure moléculaire et du mode d'action. Il faut noter les Inhibiteurs de la biosynthèse de l'érgostérol (azolés, polyènes)

inhibiteurs de la squalène-époxydase (terbinafine), inhibiteurs de la glucane-synthase (Echinocandines) (tableau VI) (Maur, 1990 ; Anatoli et Denis, 2006). Ils peuvent aussi être classés selon leur spectre antifongique ainsi que leur mode d'administration.

Tableau VI. Classification des antifongiques selon le mode d'action (Anatoli et Denis, 2006)

Structure	Mécanisme d'action	Exemple
Polyènes	Rupture de la membrane	Amphotéricine B
		Nystatine
Azols	Inhibiteur de la synthèse de l'ergostérol	Imidazoles : Ketoconazole
		Triazoles : Fluconazole
		Itraconazole
Allylamines	Inhibiteur de la synthèse de l'ergostérol	Terbinafine
		Butenafine
Pyradone	Rupture de la membrane	
Morpholine	Inhibiteur de la synthèse de l'ergostérol	Amorpholine
Pyrimidine fluorée	Inhibiteur de la synthèse de l'acide thmidylique	Fluorocytosine
Echinocandines	Inhibiteur de la synthèse des glucanes	Caspofungine
		Anidulafungine
Autres	Antimitotique, Rupture de fuseau cellulaire	Griséofulvine

3.2.1. Antifongiques d'origine naturelle

Selon la structure chimique des molécules, on distingue les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et les antifongiques de structure non polyénique pouvant être souvent antibactériens également.

3.2.1.1. Antifongiques polyéniques

Plus de 200 molécules à action antifongique, synthétisées par les actinobactéries, appartiennent à la famille des polyènes (Lortholary *et al.*, 1999). La plupart d'entre elles sont produites par des souches de *Streptomyces* (Watve *et al.*, 2001). Les antifongiques polyéniques, sont caractérisés par la présence d'un grand cycle lactone (comprenant 12 à 37 atome de carbone) possédant une partie hydrophile (6 à 14 fonctions hydroxyles) et une partie de squelette carboné hydrophobe ayant un certain nombre de doubles liaisons conjuguées (3 à

7) (Brautaset *et al.*, 2000 ; Van Bambeke et Tulkens, 2008). Cette famille est caractérisée par un groupe chromophore formé de doubles liaisons conjuguées $(CH=CH)_n$, d'où le nom polyène, ces derniers possèdent un anneau lactone macrocyclique et sont parfois dénommés macrolides polyéniques (Lortholary *et al.*, 1999). La partie active de ces composés est l'anneau macrolide avec une partie rigide lipophile et une partie flexible hydrophile (Lortholary *et al.*, 1999). Le nombre de doubles liaisons permet de les subdiviser en plusieurs sous-groupes (triènes, tétraènes, pentaènes, hexaènes et heptaènes) où chacun d'entre eux possède trois maxima d'absorption (pics) caractéristiques en lumière UV-visible (figure 09, tableau VII).

Les antifongiques polyéniques possèdent un large spectre (Watve *et al.*, 2001), ils ont à la fois une activité fongicide et fongistatique (Joffin et Leyral, 2006). Ils agissent sur les stérols membranaires des cellules eucaryotes (champignons, animaux). Leur activité non spécifique touchant même les cellules animales rend leur utilisation difficile, ce qui limite leur utilisation en thérapie (Watve *et al.*, 2001). Le large spectre d'action de ces molécules leur permet d'inhiber la croissance d'un nombre considérable de champignons filamenteux ou levuriformes, saprophytes ou pathogènes ainsi que quelques protozoaires (*Trichomonas*, *Leishmania*) ou algues pathogènes (*Prototheca filamenta* et *P. zopfii*). Cependant, ils restent inactifs contre certaines levures et champignons (*Candida*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*), les bactéries et les virus (Drouhet, 1978). En raison des problèmes liés à leur toxicité à leur instabilité et à leur insolubilité, très peu de ces antibiotiques parmi les nombreuses molécules décrites, ont trouvé une application en thérapeutique. L'amphotéricine B et la nystatine sont les plus utilisées parmi ceux commercialisés en thérapeutique (Drouhet et Dupont, 1987 ; Gupte *et al.*, 2002). Dans l'industrie alimentaire, des antifongiques comme la pimaricine et la natamycine sont utilisés comme conservateurs en fromagerie et en charcuterie (Farid *et al.*, 2000).

Le mode d'action des antifongiques polyéniques relève de divers mécanismes dont la formation de complexes insolubles avec les stérols des membrane cellulaires aboutissant à des troubles de la perméabilité cellulaire, entraînant la mort de la cellule (Joffin et Leyral, 2006 ; Gellen-Dautremer *et al.*, 2010).

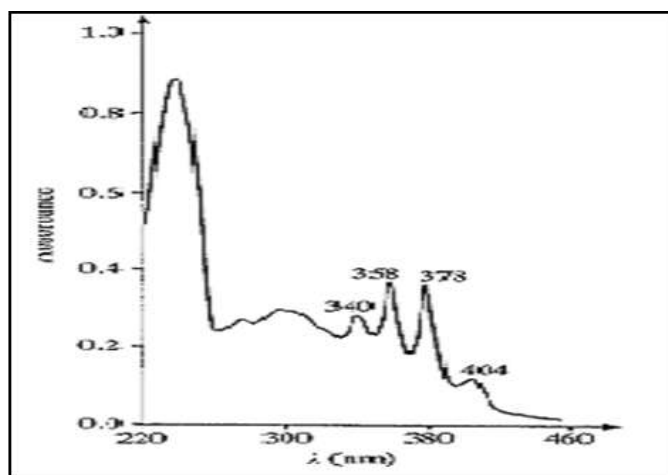


Figure 09. Spectres UV-visible d'extraits méthanoliques de mycélium contenant un antifongique de structure polyénique (**Bastide *et al.*, 1986**).

Tableau VII. Pics d'absorption en UV-visible des polyènes (**Martin, 1979**).

Polyènes	Longueur d'onde (en nm)			Exemples
	1 ^{er} pic	2 ^{eme} pic	3 ^{eme} pic	
Triènes	283	272	262	Trinénine
Tétraènes	318	304	291	Nystatine
Pentaènes	350	331	317	Eurocidine
Méthylpentaènes	357	340	323	Filipine
Carbonylpentaènes	364	Bande étendue	Bande étendue	Mucocidine
Hexaènes	380	358	340	Candihexine
Carbonylhexaènes	385	Bande étendue	Bande étendue	Dermostatine
Heptaènes	405	382	361	Amphotéricine B

3.2.1.2. Antifongiques non polyéniques

Contrairement aux antifongiques polyéniques appartenant à la famille des lactones macrocycliques, les antifongiques non polyéniques appartiennent à plusieurs familles d'antibiotiques (**Berdy *et al.*, 1987**). Il faut citer les aminoglycosides (kasugamycine, validamycine), les quinones (anthracyclines, nanomycines), les peptides (cyclosporine A,

saramycetine), les hétérocyles azotés (iodinine, tunicamycine, blasticidine S, polyoxine), les polyéthers (monensines, nigéricine), les composés alicycliques (cycloheximide), les aglycones (pradimicine, bénanomicine) et les composés aromatiques (**Berdy et al., 1987 ; Walsh et Giri, 1997**). Leur spectre UV- visible est très variable mais en aucun cas ils ne présentent les trois pics caractéristiques des polyènes (**Oroshnik et Mebane, 1963 ; Martin, 1979**). Seule la griséofulvine (produite par *Penicillium griseofulvum*) ou la pradimicine et la bénanomicine (produites par quelques espèces d'*Actinomadura*) parmi tous les antifongiques non polyéniques commercialisés (**Dupont, 2007**) sont utilisés dans le traitement des mycoses superficielles et sous cutanées. Cependant, de nombreuses molécules ont trouvés une application dans le domaine agricole, tel que l'antimycine A, l'auréofungine, la blasticidine S, le cycloheximide, l'ézomycine, la kasugamycine, les polymixines B et D, la gramicidine, la phytoactine, la validamycine, ... etc. (**Misato, 1982 ; Deacon, 1984**).

3.2.2. Antifongiques de synthèse

Les premiers composés utilisés pour leur propriété fongicide étaient soit d'origine minérale tel que sels de métaux lourds ou métalloïdes soit des produits organiques tels que les acides gras, les composés phénoliques, les dérivés benzoïques, les colorants, les ammoniums quaternaires, les dérivés triazoliques et les dérivés de la quinoléine (**Hamoir et al., 2001**). Le développement des techniques de synthèse chimique lors de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle a permis la synthèse de nombreuses molécules appartenant à diverses familles. Les premiers antifongiques de synthèse ont été utilisés en agriculture (**Odds, 1995**).

De nos jours, plusieurs de ces molécules sont utilisées en thérapeutique humaine ou vétérinaire, ainsi qu'en agriculture, tels que les analogues des nucléosides (ex., la flucytosine qui est un analogue de la pyrimidine), les allylamines (ex., la terbinafine), les azolés (ex., tébuconazole, imidazoles, fluconazole, benzimidazole), les échinocandines et pneumocandines (ex., caspofungine, micafungine), ou encore les carbamates et dérivés (ex., thiocarbamates) (**Brent, 1984 ; Koltin et Hitchcock, 1997 ; Groll et al., 1998 ; Andriole, 2000 ; Balmas et al., 2005 ; Dupont, 2007**).

3.2.3. Principaux antifongiques utilisés en thérapeutique

3.2.3.1. Origine naturelle

Nystatine

Découvert par **Hazen et Brown** en **1950**, l'appellation initiale était "fungicidin" ce nom a été changé par ses inventeurs en nystatine en l'honneur des laboratoires "New York STATE" pour lesquels ils travaillaient. La nystatine est un polyène d'un poids moléculaire de 926,1, elle possède quatre doubles liaisons conjuguées (**figure 10**). C'est une substance amphotère qui subit une détérioration en milieu acide.

La nystatine agit comme tous les autres antifongiques polyènes, en dégradant la membrane cellulaire (**Kerridge et Whelan, 1984**). Le spectre antifongique de la nystatine in vitro est très étendu, il rassemble plusieurs levures pathogènes comme les *Candida sp.* (**Hildick-Smith et al., 1964**). La nystatine est également active contre la plupart des dermatophytes et à l'égard de nombreux agents responsables des mycoses profondes y compris *Aspergillus sp.*, ainsi que de nombreuses moisissures (**Kerridge et Whelan, 1984**).

La toxicité de la nystatine administrée par voie parentérale rend son utilisation clinique limitée (**Odds, 1995**) pour les mycoses cutanée, vaginales et digestives (**Lortholary et al., 1999**). La toxicité sélective de la nystatine sur les membranes des champignons par rapport aux membranes des mammifères est due à une affinité avec l'ergostérol fongique supérieure à celle du cholestérol des mammifères (**Odds, 1995**).

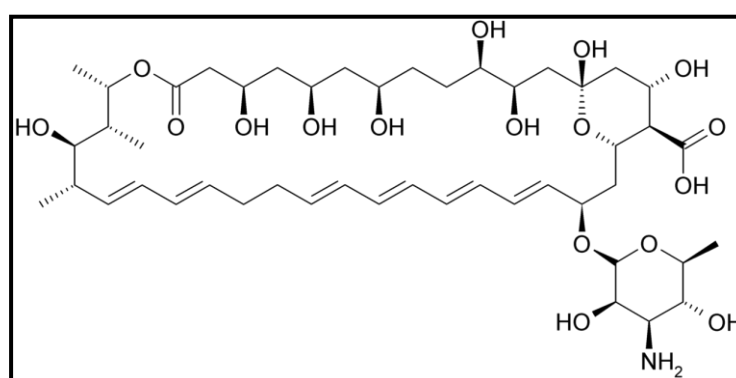


Figure 10. Structure de la nystatine.

Amphotéricine B

L'amphotéricine B est un heptaène (**figure 11**), d'un poids moléculaire de 924,09. C'est une poudre jaune insoluble dans l'eau et dans l'alcool, soluble dans des solvants organiques tel que le diméthylsulfoxyde ou diméthylformamide (**Lortholary et al., 1999**). Elle est découverte par **Gold et al. (1956)** et produite par *Streptomyces nodosus*.

L'amphotéricine B est une molécule lipophile qui augmente la perméabilité transmembranaire des membranes fongiques aux cations monovalents (Na^+ , K^+). La déplétion du potassium intra-cellulaire entraîne secondairement la mort de la cellule (**Lortholary et al., 1999**).

L'amphotéricine B est un antifongique qui inhibe spécifiquement la croissance de nombreuses levures et moisissures et est sans action contre les bactéries. C'est un puissant antifongique qui inhibe la plupart des espèces pathogènes. En médecine humaine, l'amphotéricine B est le seul polyène antifongique qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination des mycoses profondes.

L'amphotéricine B est un antifongique de référence par son spectre très large et le caractère exceptionnel des résistances acquises. Quelques souches de *Candida* ont été rapportées comme résistantes chez des patients leucémiques ou greffés de moelle. La résistance à l'amphotéricine B de certaines souches de *Candida* et *Cryptococcus*, a pu être associée à une diminution de l'ergostérol, principal stérol de la membrane cytoplasmique des cellules fongiques nécessaire à sa stabilité physico-chimique. Cependant, les mécanismes de résistance à l'amphotéricine B restent mal définis pour beaucoup d'organismes (**Reynes, 1997**). Un autre mécanisme possible de résistance à l'Amphotéricine B serait du à une augmentation de l'activité catalase, diminuant l'effet oxydatif induit par l'antifongique (**Lortholary et al., 1999**).

Plusieurs autres molécules naturelles, à part l'amphotéricine B et la nystatine, de la même classe des polyènes ont été découvertes dans les années 50. Il s'agit de la candidine, la candidine, l'étruscomycine (ou lucensomycine), la filipine, la natamycine (pimaricine ou tennecéline) et la trichomycine (hachimycine) (**Medoff et Kobayashig, 1980**). La mépartricine a été commercialisée au début des années 70 (**Simonetti et Strippoli, 1971**). Tous ces agents ont été utilisés pour le traitement des mycoses humaines.

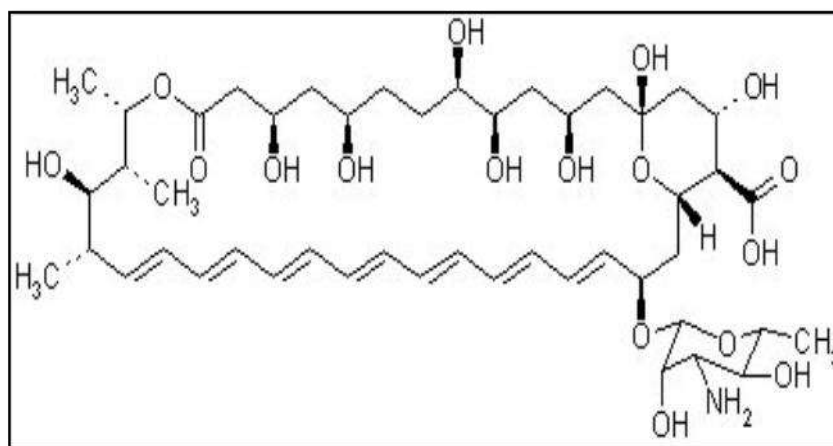


Figure 11. Structure de l'Amphotéricine B.

Griséofulvine

La griséofulvine molécule non polyénique a été isolée de *Penicillium griseofulvum* et d'autres *Penicillium sp.* (**figure 12**). Elle a été d'abord utilisée comme agent fongicide en agriculture. L'efficacité clinique du traitement oral de la griséofulvine a été démontrée en premier sur des infections à dermatophytes chez des animaux de laboratoire (**Genties, 1958**). Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche cristalline de saveur amère. Pratiquement insoluble dans l'eau, elle est facilement soluble dans l'alcool et les solvants organiques. La griséofulvine supporte l'autoclavage à condition de ne pas être en solution. Elle est chimiquement stable à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière. Son poids moléculaire est de 352,8 (**Lortholary et al., 1999**).

Parmi les champignons pathogènes pour l'Homme, les genres inhibés par la Griséofulvine sont : *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton*. Elle est utilisée également contre la plupart des dermatophytoses cutanées en particulier les teignes du cuir chevelu et les infections cutanées qui affectent la partie supérieure du corps (**Lortholary et al., 1999**).

La griséofulvine inhibe la mitose cellulaire des champignons sensibles au niveau des microtubules. Elle est responsable d'altérations de la paroi fongique s'accompagnant d'anomalies de développement des hyphes terminaux qui sont élargis, épaissis et enroulés (*curling effect*). L'action in vivo est de type fongistatique. L'apparition de résistance est possible (**Lortholary et al., 1999**).

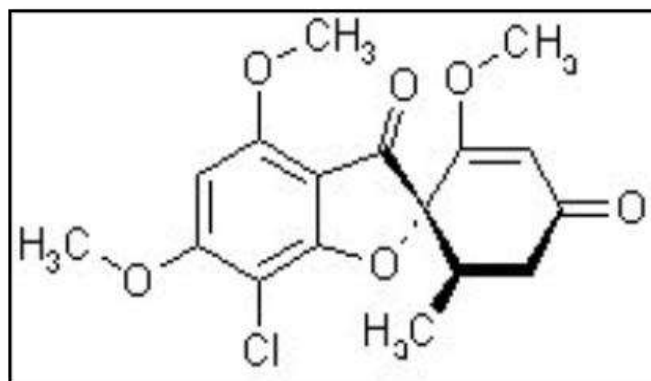


Figure 12. Structure de Griséofulvine.

3.2.3.2. Antifongiques de synthèse

Vers 1960, les antifongiques de synthèse ont révolutionné et dominent actuellement la recherche dans ce domaine. Parmi les plus utilisés, il faut noter Chlormidazole, les dérivés azolés et les allylamines.

Chlormidazole

C'est le premier antifongique de synthèse qui a été utilisé en médecine humaine. C'est un dérivé du benzimidazole qui a été utilisé pour le traitement topique des dermatophytoses cutanées. Le composé n'a pas eu un grand succès commercial mais a ouvert une voie de recherche dans le domaine des molécules antifongiques de synthèse.

Les dérivés azolés

L'utilisation, à partir de 1968, de dérivés azolés obtenus par synthèse chimique, a constitué une étape importante de la thérapeutique antifongique. Tous ces composés ont en commun le noyau azolé. Le miconazole (Daktarin) a été le premier imidazole utilisable par voie intraveineuse. Le kétoconazole (Nizoral) est le premier imidazole bien absorbé par voie orale. Il est caractérisé chimiquement par un noyau dioxolanne + et un noyau pipérazine (Lortholary *et al.*, 1999)

Les dérivés azolés, imidazolés (miconazole, kétoconazole) et triazolés (fluconazole, itraconazole) sont des agents fongistatiques qui exercent leur activité antifongique par inhibition de l'isoenzyme lanostérol 14- α -déméthylase du cytochrome P450 des mitochondries de la cellule fongique. Cette inhibition empêche la conversion du lanostérol en ergostérol, élément essentiel au maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire fongique. La déplétion en ergostérol et l'accumulation de stérols toxiques qui en résultent endommagent la

membrane cytoplasmique entraînant un effet fongistatique. À cause de cet effet sur le cytochrome P450, tous les agents de cette classe sont associés à des interactions médicamenteuses importantes en particulier avec l'isoenzyme 3A4 (Carle, 2003).

Ce sont des molécules cycliques organiques (Vandeputte, 2008), qui peuvent être divisées en imidazolés ou triazolés selon qu'il comporte 2 ou 3 azotes au sein du cycle azolé. Tous les azolés actuellement en développement sont constitués par des triazolés (Van Bambeke et Tulkens, 2008).

Allylamines

Ce groupe d'antifongiques développés en 1977 est caractérisé par sa structure chimique comportant une fonction allylamine tertiaire. Les composés de cette classe d'antifongiques inhibent l'enzyme squalène époxydase fongique qui intervient dans la voie de la biosynthèse des stérols. Parmi ces antifongiques se retrouvent la naftifine, l'amorolfine et terbinafine. Cette dernière (figure 13) est active par voie orale et topique très utilisée dans le traitement des infections à dermatophytes, l'onychomycose comprise. Le spectre antifongique de la terbinafine *in vitro* est très large, il comprend non seulement les dermatophytes, mais aussi *Candida sp.* et de nombreuses moisissures (Mieth, 1993). Cependant *in vivo*, le composé est presque complètement inactif par voie orale et est aussi nettement moins performant contre les infections superficielles à *Candida*.

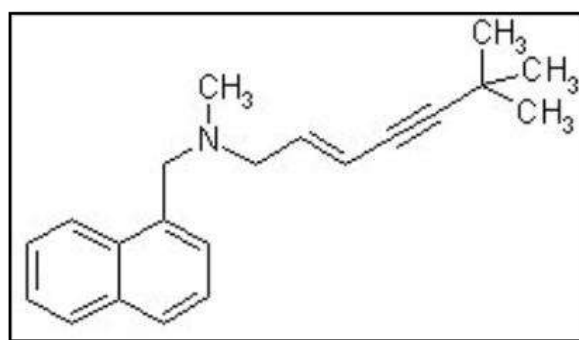


Figure 13. Structure de terbinafine (Lamisil).

3.2.3.3. Inhibiteurs de la synthèse pariétale

Echinocandines

Ces molécules sont des lipopeptides cycliques produits par divers isolats *d'Aspergillus* (Benz *et al.*, 1974). Les pneumocandines sont des molécules similaires produites par un autre

champignon le *Zalerion arboricola* (Schwartz *et al.*, 1989). Ce sont des inhibiteurs de la synthèse de la paroi fongique (Lacroix *et al.*, 2003).

Contrairement aux antifongiques azolés qui bloquent simplement la croissance des cultures fongiques, les échinocandines tuent les champignons en interrompant la synthèse des glycanes qui est un important constituant de leur paroi cellulaire. Elles inhibent précisément de façon non compétitive la (1,3)- β -D-glucane synthétase, un complexe enzymatique nécessaire à la formation des polymères de glucanes au sein de la paroi fongique. Elles empêchent ainsi l'incorporation des glucanes et des protéines associées aux glucanes dans la paroi fongique (Walch *et al.*, 2000). Elles sont fongicides sur la plupart des espèces de *Candida* et fongistatiques sur *Aspergillus*. Elles sont inactives sur *C. neoformans* (Gellen-Dautremer *et al.*, 2010). Les échinocandines représentent la seule nouvelle classe d'antifongiques mise à disposition des praticiens pour lutter contre les infections fongiques invasives (Denning, 2002).

Trois échinocandines ont vu leur utilisation clinique approuvée aux Etats-Unis et en Europe, il s'agit de : la caspofungine en 2001 (Vandeputte, 2008), issue d'un produit de fermentation de *Glarealozoyensis* (Carle, 2003), la micafungine en 2005 et enfin l'anidulafungine en 2006 (Carle, 2003 ; Vandeputte, 2008).

Nikkomycines

Ces composés sont les produits de la fermentation de *Streptomyces tendae* (Fiedler *et al.*, 1993). Ces antifongiques sont actifs sur certaines espèces du genre *Candida* et sur les pathogènes dimorphiques (*Coccidioides immitis* et *Blastomyces dermatidis*).

Les nikkomycines agissent par inhibition compétitive de la chitine synthétase, l'enzyme de synthèse de la chitine, un composé essentiel à la paroi cellulaire du champignon. La nikkomycine Z est active *in vitro* et *in vivo* contre l'*Aspergillus*, l'*Histoplasma capsulatum* et le *Blastomyces dermatidis*.

Polyoxines

Les polyoxines forment une famille de peptidonucleosides connus pour leurs propriétés fongicides. Ce sont des antibiotiques de type nucléiques isolés de *Streptomyces cacaoi var. asoensis*.

Ces composés interfèrent dans la biosynthèse de la chitine , Les polyoxines sont des analogues structuraux de l'UDP-N-acétylglucosamine et agissent par inhibition compétitive de la chitine synthase (Lepoivre, 2003).

Deux d'entre elles ont été développées au japon contre *R. solani* sur le riz (polyoxine D) et contre divers *Alternaria spp.* et *B. cinera* en arboriculture (polyoxine B). Ces antibiotiques entraînent des renflements des extrémités des hyphes mycéliens qui sont due à une inhibition de la biosynthèse de la chitine, un des polysaccharide pariétaux majeurs des Ascomycètes, Deuteromycètes, Basidiomycètes et Zygomycètes

Tableau VIII. Exemples de molécules antifongiques mises sur le marché classées selon leur mode d'action. (Modifié d'après Index of Anatomical Therapeutic Chemical Classification System 2014, WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, http://www.whocc.no/atc_ddd_index/).

Parietale / membrane cellulaire	Inhibiteur d'ergostérol	Fixation sur l'ergostérol	Polyènes anti-mycosiques	Amphotéricine B, nystatine, natamycine
		Inhibiteurs de lanostérol 14 α-déméthylase (type de cytochrome P450 lié à la bioconversion en ergostérol)	Azoles	Imidazoles (butaconazoles, kétaconazoles)
		Inhibiteur de la squalène mono-oxygénase (enzyme nécessaire à la synthèse d'ergostérol)	Allylamines	Triazoles (fluconazol, hexaconazole) Thiazoles (abafungine)
	Synthèse des lipides membranaires	Perméabilité membranaire	Carbamates (prothiocarbe, propamocarbe)	Buténafine, terbinafine
		Inhibiteur de synthèse des phospholipides	Phosphorothionates (édiphenphos, iprobenphos) Dithiolanes (isoprothiolane)	
		Péroxydation lipidiques	Hydrocarbures aromatiques (étridinazole) Dicarboximide (iprodione)	
Inhibiteur de la β-glucane synthétase	Echinocandines (casprofingine, micafungine) validamycine A			
Cible intracellulaire	Perturbation de fonctions respiratoires	Perturbation de la phosphorylation oxydative	Dinitrophényl (dinocap)	
		Inhibiteur de la succinate déshydrogénase	Carboxiamides (oxycarboxine)	
		Inhibiteur d'ATP synthétase	Organotine (fentine acétate)	
	Blocage de la polymérisation des β-tubulines lors de la métaphase (inhibiteur mitotique)	Griséofulvine		
	Inhibiteur de la thymidylate synthétase (enzyme liée à la synthèse d'acides aminés)	Flucytosine		
Perturbation de la synthèse protéique	Kasugamicine, cycloheximide			
Cibles multiples	Sulfamidés (tolylfluamide) Dithiocarbamates (Maneb, mancozeb) Produits cuivrés (bouillie bordelaise) Guanidines (dodine)			
Légende				
Cible/ mode d'action			Molécule (ou classe de molécule) antifongique	

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Dans ce chapitre il est décrit les méthodes de criblage de souche d'actinobactéries à savoir leur isolement, leur taxonomie, leur potentialité à produire de substances antimicrobiennes ainsi qu'une caractérisation partielle des molécules actives.

1. Analyses physico-chimiques des échantillons de sol

1.1. Prélèvements et échantillonnage d'étude

L'isolement des souches d'actinobactéries a été réalisé à partir d'échantillons de sol de la région de Ouargla (Sud Est de l'Algérie Latitude: 31 ° 56'57 "Nord, longitude: 5 ° 19'30" Est et altitude relative au niveau de la mer: 138 m) (**Figure 14**).

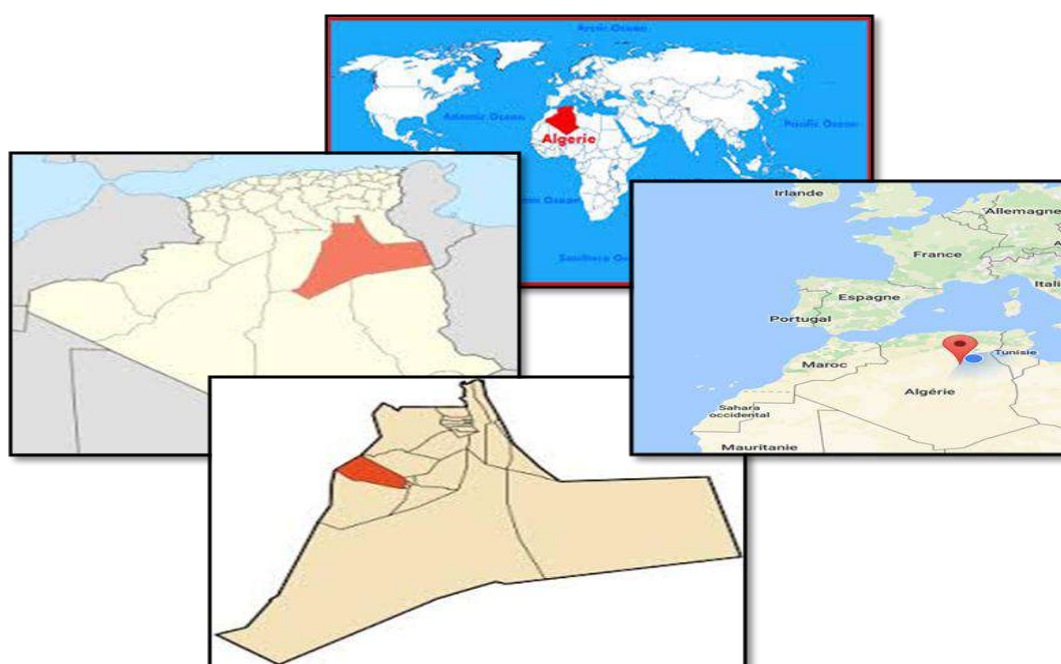


Figure 14. Situation géographique de la zone de prélèvement.

(Google Maps).

Les échantillons sont prélevés à partir de trois écosystèmes différents. Il s'agit de :

- La palmeraie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (**Figure 14 a**);
- Chott Ain El Beida : cette zone est connue pour sa richesse en sols salins. Le sol est de couleur maron foncé, l'humidité dépend de la distance par rapport au lac. Le taux de salinité à première vue est important se traduisant par la formation de cristaux de sel à la surface. Cette zone renferme quelques végétations telles que Phragmites, Juncus, ... etc. (**Figure 14 b**).

- Sabkha de Bamendil (Figure 14 c)



Figure 14 a. Situation géographique de la faculté des sciences de la nature et de la vie.



Figure 14 b. Situation géographique de la région et Chott de Ain El Beida.



Figure 14 c. Situation géographique de la région et de Sabkha de Bamendil.

Le prélèvement a été effectué selon la technique de **Pochon et Tardieux (1962)**. A l'aide d'une spatule stérile et dans des conditions d'asepsie rigoureuses à proximité d'une flamme. On écarte les 5 premiers centimètres de la couche superficielle du sol puis on prélève la couche sous-jacente entre 5 à 30 centimètres de profondeur et cela en utilisant un dispositif tubulaire stérile. Il est indispensable de multiplier les prélèvements partiels puis de les mélanger pour obtenir un échantillon moyen représentatif du sol à analyser (**Pochon et Tardieux, 1962**). Les échantillons de sol prélevés sont mis dans des flacons stériles et transportés vers le laboratoire à température ambiante. Les lots d'échantillons sont au nombre de trois à raison de dix unités de prélèvement pour chaque échantillon.

1.2. Méthodes d'analyses

Les caractéristiques physico-chimiques et granulométriques du sol sont destinées à renseigner sur les conditions naturelles de croissance des isolats ainsi que l'environnement dans lesquels ils évoluent (**Aubert, 1978**). Les tests effectués sont résumés dans le **tableau IX**.

Tableau IX. Analyses physico-chimiques des échantillons du sol (**Aubert, 1978**).

Paramètres	Méthode utilisée
pH	Potentiométrie
Conductivité électrique	Conductivimétrie
Texture	Granulométrie
Calcaire totale	Calcimètre de Bernard
Humidité	Teneur en eau
Carbone totale	Méthode de Anne
N (%)	Méthode de Kjeldahl
Matière organique (M. O.)	Méthode Anne
Ca⁺² de l'extrait 1/5	Complexométrie
Na⁺	Spectrophotomètre à flamme
K⁺	Spectrophotomètre à flamme
Mg⁺²	Complexométrie
Cl⁻	Argentométrie (Mohr)
SO₄⁻²	Gravimétrie
HCO⁻³	Titrimétrie au H ₂ SO ₄

Le détail des analyses est donné en **annexe 1**.

2. Isolement et sélection de souches d'actinobactéries productrices de substances antimicrobiennes

2.1. Techniques d'isolement

L'isolement est effectué à partir des échantillons de sol avec et sans prétraitement.

Le prétraitement consiste à sécher le sol à l'air libre avec 10% de CaCO₃ et incubé à 28 °C pendant sept jours dans une atmosphère saturée d'humidité (Cavalla et Eberlin, 1994).

Pour l'isolement, 10g d'échantillon de sol sont placés dans 90 ml d'eau physiologique contenant 9g/l d'NaCl sont vortexés et laissés sédimenter pendant 10 min à température ambiante. Des dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁵ sont préparées puis 100 µl des dilutions 10⁻³, 10⁻⁴ et 10⁻⁵ sont étalées en triplicate sur la surface des boîtes de Pétri selon la méthode de suspensions-dilutions (Rapilly, 1968). L'isolement a été réalisé sur 5 milieux de cultures différents, M2 (milieu Williams et Kuster), Bennett, ISP4, gélose à l'extrait de malt (GLM) et le glucose asparagine (GA) (annexe 2). 75 µg/ml d'Amphotéricine B sont ajoutés aux milieux de culture pour prévenir le développement des champignons filamenteux. Les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C pendant 2 à 4 semaines. Les colonies sélectionnées sont purifiées par repiquages successifs.

2.2. Purification et conservation des souches

Les souches d'actinobactéries sont purifiées sur le même milieu d'isolement exempt d'antifongiques, puis conservées selon deux méthodes :

- En gélose inclinée sur les milieux d'isolement à +4 °C pour une durée de deux à trois mois.
- En gélose inclinée sur les mêmes milieux d'isolement recouverts d'huile de paraffine, pour une bonne et longue conservation.

3. Criblage "screening" préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats sélectionnés

3.1. Microorganismes cibles

Pour déterminer les spectres antimicrobiens des actinobactéries isolées, on a utilisé des microorganismes cibles de références catalogués dans des collections mondiales telle que l'American Type Culture Collection (ATCC) (Tableau X).

Tableau X. Microorganismes cibles utilisés

Microorganismes cibles	
Bactéries	Gram positif
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
	Gram négatif
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 49452	
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	
Champignons	<i>Aspergillus carbonarius</i> A731C
	<i>Aspergillus niger</i> 2CA936
	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL
	<i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 3174
	<i>Aspergillus flavus</i> AFB1
	<i>Aspergillus parasiticus</i> (CB5)
	<i>Fusarium polyferatum</i> (Lab.MA. Bejaia)
	<i>Mucor ramanianus</i> NRRL 1829

3.2. Standardisation des inocula

Pour utiliser une charge identique pour tous les microorganismes cibles, il est nécessaire de standardiser tout les inocula. A partir d'une culture de 18h sur milieu Muller Hinton, une suspension dans l'eau physiologique de chaque bactérie cible est préparée. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0,5 McFarland (une densité optique égale à 0,5 à 650 nm) de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/ml après incorporation dans le milieu (Cavalla et Eberlin, 1994).

La standardisation des champignons est effectuée par la méthode de suspensions dilutions par mesure de la densité optique (DO = 0,5) avec un spectrophotomètre (Shimadzu UVmini. 1240) à différentes longueurs d'onde selon le germe. Le dénombrement des spores est effectué à l'aide de la cellule de Malassez, La charge de l'inoculum utilisée est de 10^7 spores /ml (Billerbeck et al., 2002 ; Matan et Matan, 2008).

3.3. Tests d'antagonisme

L'activité antimicrobienne des isolats a été testée contre plusieurs microorganismes pathogènes et phytopathogènes selon la méthode des cylindres d'agar (Patel et Brown, 1969). Les souches à tester sontensemencées en stries serrées sur le même milieu d'isolement puis incubées à 28°C pendant 7 à 10 jours. Ensuite des cylindres d'agar de 8 mm de diamètre sont découpés avec un emporte-pièce stérile puis déposés sur les milieux Muller

Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons préalablement ensemencés par le germe cible. Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4 °C pendant 2 heures pour la diffusion des substances antimicrobiennes. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) sont mesurés après 24 h d'incubation à 37 °C pour les bactéries et après 48 h d'incubation à 28 °C pour les champignons. Ce test a été répété trois fois pour chaque isolat d'actinobactérie.

4. Identification des souches

Les isolats d'actinobactéries sélectionnées pour la suite de l'étude sont ceux qui expriment les meilleurs résultats d'activité antimicrobienne avec le plus large spectre vis à vis des bactéries et champignons cibles.

4.1. Etude des caractères morphologiques

L'étude **macromorphologique** ou caractéristiques culturale consiste à déterminer la couleur du mycélium aérien et de substrat, la production de pigments solubles ainsi que la croissance et la sporulation et cela sur différents milieux de culture préconisés par l'« International *Streptomyces* Project, ISP » (Shirling et Gottlieb, 1966) (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7 et GYEA (Athalye *et al.*, 1981).

L'étude **micromorphologique** est essentielle pour l'identification du genre. Les souches d'actinobactéries isolées sur les différents milieux cités précédemment sont observées au microscope optique type Optika en utilisant les grossissements x10. L'étude repose sur l'observation directe des isolats dans la boîte de Pétri sans altérer les structures. Elle permet de voir l'aspect des colonies, les structures et la fragmentation ou non du mycélium du substrat (MS) et du mycélium aérien ainsi que la sporulation.

4.2. Analyse des constituants pariétaux

Cette analyse vise à déterminer l'isomère de l'acide diaminopimelique (DAP), la présence ou non de glycine au niveau de la paroi cellulaire ainsi que la composition cellulaire en sucres. Cette analyse est indispensable pour compléter l'identification des isolats au niveau du genre en plus des analyses morphologiques.

Les souches sélectionnées sont cultivées sur les milieux Bennett et M2 pour ITA1 et I4 respectivement à raison de 50 ml de milieu par Erlenmeyer de 250mL, les cultures sont maintenues en agitation permanente pendant 8 à 10 jours à 240 rpm à 28 °C dans un

incubateur agité. La biomasse recueillie par centrifugation à 4000 g est lavée plusieurs fois à l'eau distillée puis séchée.

4.2.1. Détermination des acides aminés pariétaux

La détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et la mise en évidence de la glycine et/ou la lysine ont été réalisées selon la méthode de **Becker et al. (1964)**.

10 mg de mycélium sec sont hydrolysés durant 18 h à 100 °C avec 1 ml d'une solution d'HCl 6 N dans des tubes en pyrex hermétiquement fermés. Après refroidissement, les tubes sont centrifugés à 5000 g durant 30 mn à la température ambiante puis décantés. Le liquide obtenu est évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur à 40°C. Le résidu est dissout dans 1 ml d'eau distillée puis soumis à une nouvelle évaporation. Le processus est répété plusieurs fois afin d'éliminer tout l'acide chlorhydrique. Après avoir obtenu un pH compris entre 5,5 et 7, le résidu est à nouveau dissout dans 0,3 ml d'eau distillée.

20 µl de l'hydrolysate d'actinobactéries sont chromatographiés sur papier Whatman n° 1 ; Le solvant utilisé est un mélange de méthanol-eau distillée-HCl 10N-pyridine (80-17, 5-2, 5-10, en volume) (**Becker et al. 1964**). Les papiers sont développés durant 14 à 18 h par chromatographie descendante. L'acide DL- α qui est un mélange des isomères LL, DD et est utilisé comme standard en chromatographie à raison de 10 µl d'une solution à 0,01M. Cette méthode de chromatographie ne différencie pas la forme méso de la forme DD, mais cette dernière est relativement rare et considérée comme négligeable (**Gordon et al., 1974**). Les chromatogrammes sont révélés par une solution de 0,2 % de ninhydrine dans l'acétone (poids, volume) (**Becker et al., 1964**) et chauffés durant 2 mn au four à 100°C. Les taches de DAP sont de couleur vert pale, virant rapidement au jaune alors que les autres acides aminés ont une couleur violette. Dans ce système, la forme LL migre plus rapidement que la forme méso.

4.2.2. Détermination des sucres pariétaux

Pour la caractérisation des sucres présents, on utilise la méthode de **Lechevalier et Lechevalier (1970)** modifiée par **Antoun et al. (1978)**. Dans des tubes en pyrex contenant 50 mg de mycélium sec, on ajoute 2 ml d'une solution de H₂SO₄ N, puis les tubes fermés hermétiquement sont portés à 100 °C durant 1h. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 5,5 ou 6 en ajoutant une solution saturée d'hydroxyde de baryum, le précipité blanc qui se forme est séparé par centrifugation à 5000 g durant 30 mn à la température ambiante. Le liquide ainsi obtenu est évaporé à sec à 40°C à l'aide d'un évaporateur et le résidu est dissout dans

0,3 ml d'eau distillée. 20 µl d'hydrolysats de souches sélectionnées sont chromatographiés sur papier Whatman n° 1 en utilisant comme solvant la partie supérieure d'un mélange composé de n butanol-eau distillée-pyridine-toluène (5-3-3-4 en volume) (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**). Les papiers sont développés durant 36 à 56 h par chromatographie descendante. Les sucres sont révélés avec une solution acide de phthalate d'aniline au four à 100 °C pendant 5 mn. (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**). 10µl des solutions standard à 0,1% : arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, ribose, et xylose sont utilisées pour identifier les sucres. Les taches apparaissent de couleur rose pour les pentoses et brune pour les hexoses.

4.3. Caractères physiologiques

Une série de tests physiologiques sont utilisés par les taxonomistes pour la différenciation des différents groupes d'actinobactéries (**Holt et al., 1994**).

Production de pigments mélanoides (mélanine)

La capacité des isolats à produire des pigments mélanoides est testée sur les milieux ISP6 et ISP7 recommandés par **Sherling et Cottlieb (1966)**.

Production de catalase

Deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes sont déposées sur une colonie d'actinobactérie âgée d'une semaine et poussant sur l'agar nutritif ou milieu d'isolement, si la souche possède une catalase, il est observé un dégagement immédiat de bulles gazeuses (**Marchal et Bourdon, 1973**).

Utilisation de sources de carbone

Elle est estimée en appréciant la croissance des actinobactéries sur milieu solide contenant une seule source de carbone en notant la production d'acide ou de bases à partir de cette source sur milieu solide ou liquide.

Utilisation des composés glucidiques

Consiste à apprécier la croissance de l'actinobactérie en présence de composés glucidiques (10 g/l), comme seules sources de carbone, additionnés à un milieu minéral de base l'ISP9 (**annexe 2**) (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Le test est considéré comme positif lorsque la croissance est supérieure à celle du témoin sans sucres. Les glucides et dérivés

testés sont les suivants: glucose, arabinose, fructose, cellobiose, galactose, lactose, maltose, mannitol, ribose, rhamnose, xylose, mannose.

Utilisation des acides aminés

Le test consiste à comparer la croissance des isolats sélectionnés en présence de 0,1% d'histidine, de Lysine et d'arginine, comme seules sources d'azote par rapport à un témoin sans acides aminés (**Holt *et al.*, 1994**). Ces acides aminés sont ajoutés aseptiquement au milieu de base.

Utilisation des acides gras

L'utilisation des acides gras comme seule source de carbone est réalisée sur le milieu préconisé par **Gordon (1974)** composé de : acide gras : 2 g, NaCl : 1 g, MgSO₄, 7H₂O : 1 g, KH₂PO₄ : 1 g, (NH₄)₂HPO₄ : 1 g, agar : 15 g, eau distillé q.s.q : 1000 ml. Le pH est ajusté à 6,8. 20 ml d'une solution aqueuse à 0,04 % de rouge de phénol sont ajustés avant autoclavage. Les acides gras utilisés sont : l'acétate, citrate, lactate, benzoate, oxalate et pyruvate de sodium. Les lectures se font en appréciant la croissance des souches et notant le virage du jaune au rouge de l'indicateur coloré du à la libération de bases alcalinisant le milieu de culture.

Hydrolyse de tyrosine

La décomposition est réalisée selon la méthode de **Gordon *et al.* (1974)**, 1 g de tyrosine est solubilisé dans 20 ml d'eau distillé puis stérilisé à l'autoclave. La suspension est ensuite complétée à 200 ml avec l'agar nutritif stérile refroidi à 45°C et distribué dans des boîtes de Pétri stériles. Les boîtes ensemencées sont mises à incuber à 30°C pendant 20 jours. Les lectures consistent à observer les zones de dégradation (zones claires) de ces composés, autour des colonies des souches sélectionnés.

Hydrolyse de l'amidon

2 g d'amidon soluble sont dissous dans 200 ml d'agar nutritif. Après autoclavage, le milieu est réparti dans des boîtes de Pétri stériles. Les lectures se font chaque jour en répandant du lugol dans les boîtes de Pétri. Le milieu se colore en bleu, sauf là où l'amidon est hydrolysé (**Gordon *et al.* 1974 ; Marchal et Bourdon, 1973**).

Hydrolyse de caséine de lait

10 g de lait écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées dans des boîtes de Pétri stériles. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique l'hydrolyse de la caséine (**Gordon et al., 1974**).

Hydrolyse de tween 80

10 gouttes de tween 80 (ou polyoxyéthylène sorbitan monooléate) autoclavés sont ajoutées à 25 ml de milieu composé de : peptone bactériologique : 10 g, chlorure de sodium : 5 g, chlorure de calcium : 0,1 g, agar : 25 g, eau distillé : 1000 ml. Il se forme un halo opaque autour des colonies hydrolysant le tween 80 du à la précipitation des acides gras (**Marchal et Bourdon, 1973**).

Croissance à différents pH et températures

Les tests de croissance sont effectués sur agar nutritif, M2 ou Bennett aux : Températures suivantes : 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50 °C.

pH suivants : 5, 6, 7, 8, 9, 10. Les différents pH sont obtenus à l'aide d'un tampon phosphate. La croissance à différent pH sur milieu liquide est obtenue en mesurant quotidiennement la densité optique.

Croissance en milieu hypersalin

Le test consiste à estimer la croissance des souches d'actinobactéries sur milieu M2, Bennett ou agar nutritif additionné de 5%, 8%, 11% et 15% de chlorure de sodium.

4.4. Identification moléculaire des isolats sélectionnés

Elle a été réalisée sur les quatre isolats ITA1, AB26, AB21 et AB24. L'étude moléculaire a été réalisée au niveau de l'Institut Pasteur, Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), Pôle d'Identification Bactérienne (PIB) de Paris (FRANCE) avec les techniques décrites ci après.

4.4.1. Extraction de l'ADNr 16S

Des cultures de 5 jours à 28°C sont réalisées sur milieu M2 et Bennett liquide, les cultures sont centrifugées pendant 10 min à 8000 g et le culot récupéré est lavé 3 fois avec l'eau distillée. 150 mg de mycélium de chaque isolat sont utilisés pour l'extraction d'ADN avec 800 µL de la solution de lyse composée de : Tris-HCl (100 mM, pH 7,4); EDTA (20 mM); NaCl (250 mM); SDS (2%); Lysozyme (1 mg.mL⁻¹); H₂O ultra pure (qsp 100 mL). 5 µL de RNase A (50 mg.mL⁻¹, Euromedex) sont ajoutés, la suspension est incubée 60 min à 37°C. 10 µL de protéinase K (20 mg/mL, Euromedex) sont ajoutés et la solution est incubée 30 min à 65°C. 800µL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (Sigma) (v/v) sont ajoutés au lysat cellulaire afin d'extraire l'ADN. Après centrifugation 10 min à 7000g, les phases supérieures sont récupérées et transférées dans un nouveau tube Eppendorf stérile. Après addition de 1 volume de NaCl (150 mM) et 2.5 volume d'éthanol absolu. Le contenu du tube est centrifugé 15 min à 7000g. Le culot d'ADN est séché puis re-suspendu dans 50 µL de tampon TE : 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) et 1 mM EDTA (pH 8,0). L'ADN génomique est stocké à - 20°C.

4.4.2. Amplification de l'ADNr 16S

Le 16S rADN a été amplifié par PCR en utilisant une Taq DNA polymérase (Bio Basic Inc., Canada). Les amorces sont 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Le volume réactionnel est de 50 µL, composé de tampon PCR (10 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, pH 9.0 at 25 °C), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 1 µM de chaque amorce, 1.25 U de la Taq DNA polymérase et 5 µL d'ADN. Les extraits sont déposés dans des tubes à Eppendorf avec un témoin (blanc sans ADN) dans le thermocycleur. L'amplification est réalisée en 30 cycles. Une dénaturation initiale de l'ADN à 98°C pendant 3 min suivie par une dénaturation à 94°C pendant 1 min, puis hybridation à 53°C pendant 1 min et finalement l'élongation à 72°C pendant 5 min.

4.4.3. Arbre phylogénétique

La comparaison des séquences et la recherche d'homologie sont réalisées respectivement avec NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) et le programme BLAST recherche BLASTN. Les séquences correspondantes à des espèces proches sont extraites de GenBank et utilisées pour les analyses phylogénétiques. La méthode de Neighbor-Joining est utilisée pour la réalisation d'arbre phylogénétique à l'aide du logiciel MEGA version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Le programme est précédé par une série d'alignement de séquences avec le logiciel BioEdit, version 7.0 (Hall, 1999).

5. Extraction, semi-purification et essai de caractérisation des principes actifs des souches sélectionnées

5.1. Pré-cultures et Cultures

Des souches d'actinobactéries âgées de 8 à 10 jours sont préparées pour obtenir des pré-cultures, les spores sont raclées à partir des cultures en boîte de Pétri et inoculées dans des Erlen de 250 ml contenant 50 ml de milieu Bennett et M2 selon le cas. Après 48 h d'incubation agitée (28°C, 240 rpm), les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux de production.

Des Erlen de 500 ml contenant chacun 100 ml de milieu liquide M2 et Bennett sontensemencés par 3 ml (3% du volume utile) d'inoculum âgé de 48 h en phase exponentielle de croissance. Le volume inoculé correspond à une concentration de biomasse initiale de 0,1 à 0,2 g /l. Les cultures sont incubées à 28 °C et agitée.

5.2. Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques

L'objectif est de déterminer l'optimum de production des antibiotiques. Les cinétiques de production ainsi que l'évolution de la biomasse et du pH sont réalisés dans deux milieux de culture à savoir Bennett et M2 (**annexe 2**) avec respectivement les souches ITA1 et I4.

L'évolution de la croissance, du pH et de la production des antibiotiques sont relevés pendant 10 jours. Des prélèvements journaliers sont effectués en cours de fermentation toutes les 24 h dans des conditions d'asepsies rigoureuses à partir des fioles en agitation. Le volume prélevé dépend du type d'analyses à effectuer, il est généralement de 5 à 7 ml.

La concentration cellulaire (biomasse) est exprimée selon la méthode de **Pfefferle et al. (2000)**. 2 ml de culture sont prélevés toutes les 24 h puis centrifugés à 5000g pendant 20 min dans des tubes d'Eppendorff. Le culot cellulaire est récupéré, lavé trois fois à l'eau distillée, égoutté puis transféré dans une capsule préalablement tarée. Cette dernière est étuvée à 105°C et le poids sec (en g/l) est déterminé après 24 h de séchage.

L'évolution de la production des antibiotiques est réalisée par la technique de diffusion sur gélose par la méthode des puits avec *B. subtilis* et *A. ochraceus* pour l'isolat ITA1 et *A. niger* et *A. ochraceus* pour I4. 3ml de milieu de culture sont prélevés chaque 24h à raison de 1 ml par tube Eppendorff puis centrifugés à 6000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnagent

est stérilisé par filtration sur membrane Millipore (0,45µm de diamètre). Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré après 24h à 36h pour les bactéries et 2 à 5 jours d'incubation pour les champignons.

5.3. Nouvelle approche pour l'optimisation des paramètres de culture par « Response Surface Methodology –RSM- »

La composition d'un milieu de culture peut réguler la production en réprimant les gènes de biosynthèse des enzymes du métabolisme secondaire et/ou en inhibant leur activité. Les milieux doivent permettre de fournir sans limitation les précurseurs nécessaires aux synthèses des antibiotiques tout en évitant ces phénomènes de répression et/ou d'inhibition. Toutefois des études d'optimisation doivent être réalisées afin d'améliorer cette production, ceci en déterminant les conditions physiologiques et nutritionnelles amenant à une production maximale (Singh *et al.*, 2009 ; Vijayakuma *et al.*, 2010).

L'approche statistique expérimentale est une méthode recommandée pour déterminer les concentrations optimales des variables choisies (Niladevi *et al.*, 2009).

L'objectif de cette étude est d'optimiser la production d'antibiotique pour les deux souches ITA1 et I4 en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses ou « Response Surface Methodology –RSM-». L'RSM consiste en un groupe de techniques empiriques destinées à l'évaluation des relations existant entre un groupe de facteurs expérimentaux contrôlés et les réponses mesurées selon un ou plusieurs critères sélectionnés (Teruel, 1997 ; Silva et Roberto, 2001 cité par Elibol, 2003).

La méthodologie adoptée est la suivante:

- Application du modèle donné par le logiciel «MINITAB 17 » en vue de l'optimisation de la production d'antibiotiques par les deux souches ITA1 et I4;
- Détermination des concentrations optimales de ces variables ;
- La confirmation du modèle.

5.3.1. Optimisation des composants du milieu de culture par RSM

La conception expérimentale de Plackett-Burman a été choisie pour l'évaluation initiale des composants des milieux M2 et Bennet. Sur la base de l'analyse préliminaire de Plackett-Burman, en fonction des faibles valeurs p (<0,05) et des niveaux de confiance élevés (> 90%), pour tester l'expérience de la conception de Box-Behnken (Jubi *et al.*, 2017).

La détermination des concentrations optimales en sources de carbone, d'azote et de sel (NaCl) permettant une bonne production d'antibiotiques pour les souches ITA1 et I4 a été effectuée par une étude statistique expérimentale, en utilisant un logiciel au plan d'expérience « MINITAB 17 » par le modèle « Box Behnken » (Niladevi *et al.*, 2009).

Cette étude a été réalisée sur milieu Bennett pour la souche ITA1 et milieu M2 pour la souche I4. Les variations des concentrations portent essentiellement sur les différentes sources d'azotes (casaminoacide, d'extrait de levure et d'extrait de viande) pour la souche ITA1 et de source de carbone (amidon), d'azote (caséine) ainsi que sur la concentration en NaCl pour la souche I4 comme le montre les tableaux **XI** et **XII** respectivement.

L'équation de régression obtenue sur la base de l'expérience s'écrit sous la forme suivante :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Où :

X_i : Les variables correspondant aux facteurs étudiés (sources de carbones, sources d'azotes ainsi que la NaCl)

Y : la production d'antibiotique prédite par le modèle pour ces valeurs expérimentales (Niladevi *et al.*, 2009, Xianoyong *et al.*, 2010).

Les coefficients :

β₀: constante de l'équation de régression ;

β_i : coefficient linéaire ;

β_{ii} : coefficient quadratique ;

β_{ij}: coefficient d'interaction ;

Ce plan factoriel admet que la réponse est linéaire quand un facteur passe d'un niveau minimal à un niveau maximal symbolisé par les signes (-) et (+) définissant la valeur basse et haute de chaque facteur respectivement. Ainsi les facteurs choisis ont été analysés à trois niveaux : la concentration la plus basse, la moyenne et la plus haute ce qui donne respectivement -1, 0 et +1 (tableaux **XI** et **XII** respectivement), donc un total de quinze modèles expérimentaux a été livré par ce logiciel.

Les 15 expériences ont été réalisées par culture en milieu liquide des deux souches ITA1 et I4 (10 jours à 28°C) sous une agitation de 250 rpm. Les surnageants des cultures obtenues ont subi une concentration au Rotavapor jusqu'à 5 ml puis stérilisés par des filtres millipores de l'ordre de 0,45 µm. 150 µl de chaque filtrat a été testé contre *B. subtilis*. Le diamètre des zones d'inhibitions a été mesuré pour les 15 expériences. Cette valeur

correspond au Y pour chaque expérience (Y1, Y2,Y15), valeurs ont été introduites dans le logiciel comme valeurs correspondantes afin d'obtenir les concentrations optimales des sources étudiées.

La compétence statistique du modèle a été résolue par l'analyse de la variance (ANOVA). L'excellence de l'équation du modèle polynomial a été conclue statistiquement par le biais du coefficient de détermination (R²) et ajusté R². Des diagrammes de surface à trois dimensions ont été produits pour élucider la relation entre les réponses et les niveaux expérimentaux de chaque variable indépendante. Le niveau optimal des variables pour l'activité antibactérienne maximale a été résolu par l'outil d'optimisation de réponse du logiciel (Jubi *et al.*, 2017).

Tableau XI. Modèle expérimental de « Box-Behnken » pour le criblage de variables significatives affectant la production d'antibiotique par la souche ITA1 sur le milieu Bennett.

Run	Blk	A	B	C
1	1	-1	0	1
2	1	1	-1	0
3	1	1	1	0
4	1	0	-1	1
5	1	-1	-1	0
6	1	-1	0	-1
7	1	0	1	1
8	1	0	0	0
9	1	1	0	1
10	1	-1	1	0
11	1	0	0	0
12	1	0	0	0
13	1	0	1	-1
14	1	1	0	-1
15	1	0	-1	-1

A : Casaminiacide, B : E. de levure, C : E. de viande

Tableau XII. Modèle expérimental de « Box-Behnken » pour le criblage de variables significatives affectant la production d'antibiotique par la souche I4 sur le milieu M2.

Run	Blk	A	B	C
1	1	0	0	0
2	1	-1	-1	0
3	1	1	-1	0
4	1	0	0	0
5	1	0	1	1
6	1	0	1	-1
7	1	0	0	0
8	1	-1	0	-1
9	1	0	-1	1
10	1	1	1	0
11	1	0	-1	-1
12	1	1	0	1
13	1	1	0	-1
14	1	-1	0	1
15	1	-1	1	0

A : Caseine, B : Amidon, C : NaCl

5.3.2. Validation du modèle statistique

Le modèle mathématique et l'optimisation ont été validés expérimentalement en cultivant les souches ITA1 et I4 en milieu liquide. Après pré-cultures de 3 jours puis des cultures de 10 jours. Le surnageant de culture sont concentrés à un volume de 5 ml, stérilisé par filtre millipore puis testés contre *B. subtilis*. Les tests d'activité antibiotique sont réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. La zone d'inhibition obtenue a été comparée à l'intervalle prédit par le logiciel en respectant une marge d'erreur définie.

5.4. Extraction des principes actifs et choix des solvants d'extraction

Les molécules bioactives sont des métabolites secondaires non essentiels pour la croissance et la reproduction de certains microorganismes mais sont une forme de défense. Ces molécules actives sont généralement extracellulaires et leur purification à partir de surnageants de culture complexes nécessite diverses techniques de séparation telles que l'extraction par solvant, la précipitation chimique, HPLC, les études spectroscopiques etc. Le nombre de techniques à utiliser dépend de la nature de la molécule.

Après avoir réalisé des cultures liquides en Erlen pour chaque souche et obtenu le filtrat de culture, une extraction par des solvants organiques de différentes polarités est

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

5.4.1. Extraction à partir du mycélium

Le mycélium récupéré après filtration ou centrifugation est lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation à 3000 g pendant 10 min pour se débarrasser des impuretés et autres résidus du milieu, Le culot mycélien est égoutté puis pesé. 1g de mycélium humide est extrait avec 50 ml de méthanol sous agitation durant 2h à température ambiante. Après filtration sur verre fritté n° 3 et évaporation sous vide à 40°C, le produit sec est repris dans 2 ml de méthanol et testé par antibiographie (**Mechlinski, 1978**).

5.4.2. Extraction à partir du filtrat de culture : antibiographie et choix des solvants d'extraction

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. 5 solvants de polarité croissante sont utilisés : le n- hexane, le benzène, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n- butanol. Afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction (**Valan Arasu, 2009**), le filtrat est mélangé dans une ampoule à décanter avec un volume égal de solvant, les deux phases organiques et aqueuses sont récupérées séparément concentrées à sec puis reprises dans un minimum de méthanol ou d'eau.

L'activité inhibitrice des différentes phases organiques et aqueuses obtenues est testée par antibiographie avec la méthode des puits en utilisant le milieu Muller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons préalablement ensemencés avec les germes cibles. Des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés à l'aide d'un emporte pièce, une aliquote de 150 µl de surnageant de culture est prélevé stérilement puis introduit dans les puits préalablement tapissés par une goutte de gélose blanche. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h afin de permettre une diffusion des substances actives tout en arrêtant la croissance des germes, puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 28°C pour les champignons. La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions autour des puits après 24 h pour les bactéries et 48 h pour les champignons.

5.5. Essai de caractérisation partielle des principes actifs

5.5.1. Chromatographie analytique sur couche mince

Les plaques de gel de silice sont préparées en mélangeant 100 ml d'eau avec 40 g de silice et du gypse dans un Erlenmeyer de 250 ml. Après agitation manuelle vigoureuse, le gel

obtenu est étalé de manière uniforme sur des plaques en verre (20 ×20 cm ou 10× 20 cm) à l'aide d'un étaloir de manière à obtenir une couche fine de 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques sont ensuite séchées à 40°C pendant une nuit et régénérées à 105°C pendant 30 min 1 heure avant utilisation.

Des dépôts de 30 µl d'extrait actif sont déposés sous forme de spots à 3 cm du bord inférieur de la plaque et à 2 cm des bords latéraux, les spots sont séchés sous courant d'air froid entre chaque application. Les cuves rectangulaires utilisées contiennent 100 ml d'éluant, l'atmosphère est saturée pendant 2 h avec les vapeurs du système de solvant choisi avant d'y introduire les plaques.

Les différents systèmes de solvant utilisés sont:

- A. Méthanol-acétate d'éthyle (100 :15) : M.A.E.
- B. N-butanol-acide acétique-eau (3 :1 :1) et (6 :1,5 :2) : B.A.E et B.A.E.M (B.A.E modifiée).
- C. Ethanol-triéthylamine-eau (8 :1 :1) :E.T.E.
- D. Ether de pétrole-acétate d'éthyle (7 :3) :E.A.E.
- E. Chloroforme-méthanol (8 :2) :C.M

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance d'environ 15 cm à partir du dépôt. Le solvant est éliminé de la plaque par simple évaporation à température ambiante. Le chromatogramme est observé à l'œil nu et sous lumière ultraviolet ($\lambda = 245$ et 356 nm) et les spots (absorption et fluorescence) qui apparaissent sont notés.

5.5.2. Bioautographies : Révélations microbiologiques

La bioautographie est réalisée selon la méthode de **Betina (1973)**. C'est une révélation microbiologique des chromatogrammes. Elle consiste d'une part à détecter les tâches séparées actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre et leur R_f (rapport frontal), et d'autre part à choisir le meilleur système de solvant de migration permettant de séparer au mieux les antibiotiques entre eux ou des autres composés non actifs.

Chaque plaque est placée horizontalement sur des supports en verre dans une boîte en polyéthylène (22 x 24 cm) nettoyée à l'éthanol et contenant à sa base un papier filtre. Le dispositif est stérilisé sous UV à 254 nm durant 30 min. Parallèlement, 50 mL d'une gélose molle de Sabouraud à 7 g L⁻¹ d'agar en surfusion (45°C) sont inoculés avec une suspension du

germe-cible. 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, une petite quantité d'eau stérile est ensuite ajoutée au fond de la boîte et sur la feuille de papier pour permettre de maintenir une atmosphère humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour empêcher la croissance du germe cible et permettre en même temps la diffusion des produits de la plaque de gel de silice vers la gélose puis incubées à 28°C. La lecture se fait après 24 à 48 h, Les zones d'inhibition des tâches actives sont alors observées et le Rf des antibiotiques est calculé selon la formule suivante :

$Rf = \text{distance de migration entre dépôt et tâche active} / \text{distance de migration entre dépôt et front du solvant.}$

5.5.3. Révélations chimiques (réactions chromogéniques) des substances actives

Des réactions chromogéniques sont effectuées sur des plaques de gel de silice développées de la même manière que pour les bioautographies pour avoir une idée sur la nature chimique des molécules présentes.

Les révélateurs utilisés (Merck, 1975) sont les suivants:

- le Diphénylamine-aniline: révélateur des glucides.
- la ninhydrine: révélateur des fonctions amines.
- le chlorure de fer ferrique: révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.
- le formaldéhyde-H₂SO₄: révélateur des composés aromatiques polycycliques.
- Réactif de Tollens: révélateur des alcools supérieurs des stéroïdes et des huiles étherées.

Les taches colorées peuvent apparaître à froid et/ou à chaud (5 min à 100°C).

5.5.4. Spectroscopie UV- visible

Le spectre UV-visible est déterminé entre 190 - 600 nm sur les extraits bruts, afin de noter la présence ou l'absence de composés polyéniques lesquels présentent 3 pics, caractéristiques à chaque type de polyènes.

Les extraits sont solubilisés dans 5 ml de méthanol pur puis analysés par spectrophotomètre UV-vis, précédemment étalonnés avec du méthanol.

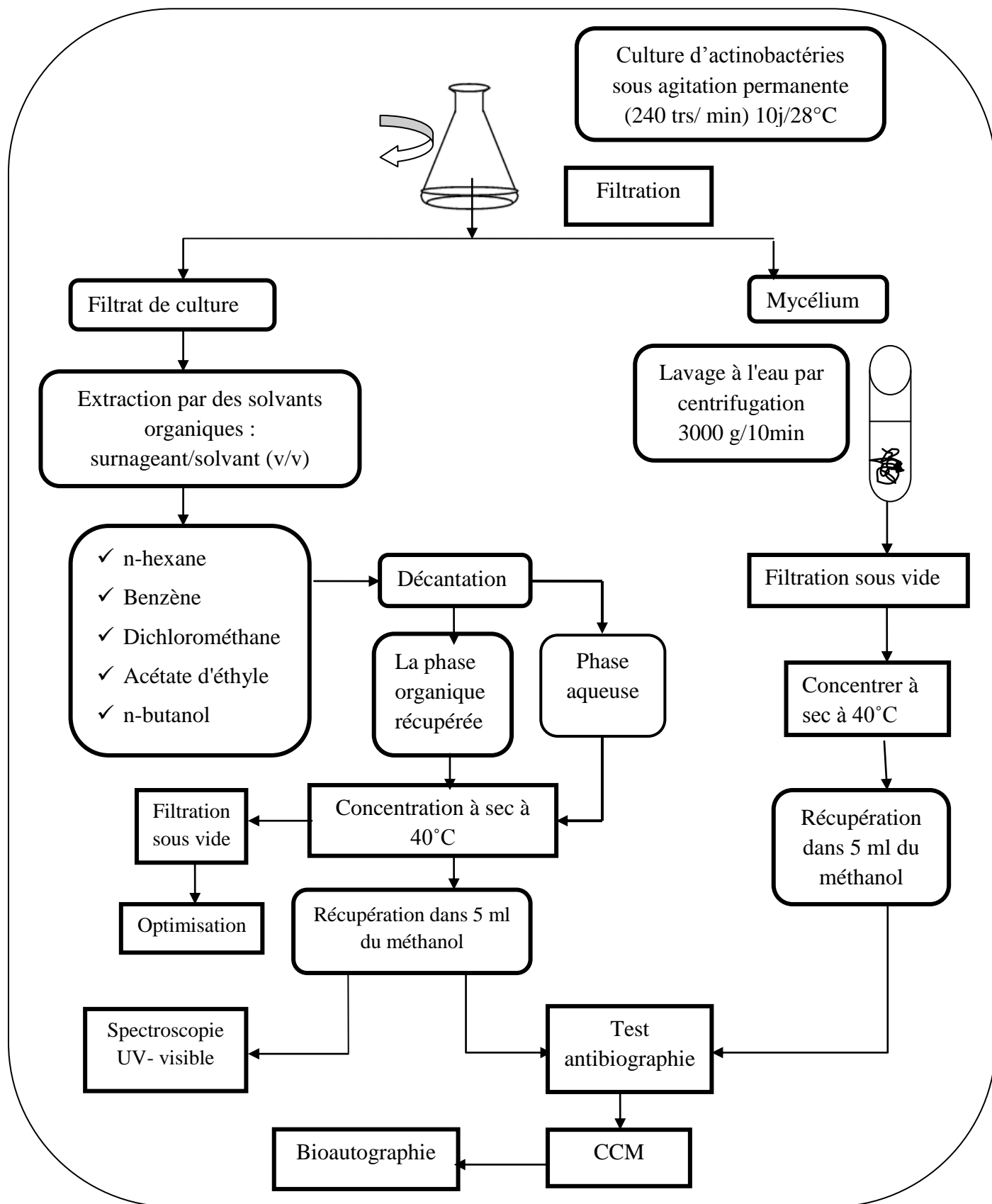


Figure 15. Récapitulatif du protocole d'extraction des antibiotiques à partir de mycélium et de filtrat de culture et semi purification des antibiotiques.

Chapitre III.

Résultats et discussions

1. Analyses physico-chimiques des échantillons de sol

Pour isoler un plus grand nombre d'actinobactéries d'écosystèmes différents, les échantillons de sol étudiés sont prélevés de trois stations différentes : la palmeraie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, le Chott Ain El Beida et la Sebkhia de Bamendil de la région de Ouargla. Les deux dernières stations sont caractérisées par une salinité de sol élevée.

Tableau XIII. Analyses physico-chimiques des sols de différentes stations d'étude.

Paramètres physico-chimiques	Sebkhia de Bamendil	Chott Ain El Beida	Palmeraie SNV
Texture	Sableuse fine	Argilo-sableuse	Sableuse fine
pH	6,88	7,02	7,76
Conductivité électrique CE. à 25°C (dS/m)	13,2	30,4	14,30
Humidité (%)	35,4	18	12,34
Calcaire total (%)	4,06	0,5	12,04
M.O %	0,6	1,4	2,23
N (%)	0,33	/	0,098
C.O (%)	0,35	0,86	1,3
Ca+2de l'extrait 1/5	96,74 (mg/l)	5,45 (meq/L)	0,725 (cmol/kg)
Na+	1428,5	55,75	0,6
K+	74,85	64,43	0,56
Mg+2	/	/	9,75
Cl-	3084,9	33	2
SO4 -2	16435,2	38	0,202
HCO3 -	244	18,9	1,2

L'analyse du sol de la palmeraie montre qu'il s'agit d'un sol légèrement alcalin (pH de 7,76), non salé (C.E. 14,30 ms/cm), une texture sableuse fine. Le taux de calcaire est de l'ordre de 12,04 %, une faible humidité de l'ordre de 12,34 %, une teneur en carbone total de 1,3 % et une faible teneur en azote de l'ordre de 0,098 % ; c'est un sol moyennement riche en matière organique de l'ordre de 2,23 %. L'analyse des minéraux révèle la présence du Ca^{+2} (0,725C mol/Kg), Na^+ (0,6 Cmol/Kg), K^+ (0,56 Cmol/Kg) et Mg^{+2} (9,75 Cmol/Kg) (**Tab. XIII**).

Le sol du Chott Ain Beida est un sol à pH neutre, extrêmement salé de texture argilo-sableuse, pauvre en calcaire et en matière organique avec une humidité moyenne et ne contient pas d'azote. C'est un sol riche en éléments minéraux à savoir le Na^+ , K^+ et le Cl^- . Le sol de Sebkhia de Bamendil a un pH neutre, extrêmement salé de texture sableuse fine, pauvre en

calcaire, en matière organique ainsi qu'en azote ; l'humidité est élevée, c'est un sol très riche en éléments minéraux à savoir Ca^{+2} , Na^+ , Cl^- et SO_4^{-2} .

L'analyse de sol est un paramètre important, il influe directement sur les microorganismes du sol et particulièrement les actinobactéries. Le taux de calcaire influe fortement la distribution quantitative et qualitative des actinobactéries dans le sol (**Sabaou et al., 1992**). La répartition des actinobactéries dans les différents sols dépend en général de plusieurs facteurs, tel que la disponibilité des éléments nutritifs, la température, l'humidité, le type de sol, la saison de prélèvement des échantillons et le climat (**Oskay, 2009**).

Lee et Hwang, (2002), ont signalé l'influence de l'humidité sur la diversité des actinobactéries dans le sol. *Micromonospora*, *Dactylosporangium* et *Streptosporangium* préfèrent des sols où l'humidité varie entre 2,0 à 9,0%, les *Actinomadura* et les actinobactéries nocardioformes sont abondants dans les sols avec 13,1 à 20,0% d'humidité tandis que les *Streptomyces* prédominent dans tous les sols.

2. Isolement et sélection de souches d'actinobactéries productrices de substances antimicrobiennes

Un total de 112 isolats a été isolé à partir des différents échantillons de sol analysés. 91 isolats sont obtenus à partir d'échantillons prélevés de la palmeraie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, 20 isolats à partir de Chott Ain El Beida et un seul isolat à partir de Sabkha de Bamendil (**Tab. XIV**).

Le **tableau XIV** montre que le nombre des actinobactéries isolées de la palmeraie de la faculté des sciences de la nature et de la vie est nettement supérieur, ceci s'explique par sa richesse en matière organique par rapport aux Chott Ain El Beida et de la Sabkha de Bamendil qui présentent un degré de salinité élevé. **Lee et Wang, 2002** rapportent que le nombre d'actinobactéries est positivement affecté par le taux de matière organique quelque soit le taux de la salinité du sol. D'autre part, le nombre d'actinobactéries isolées est inversement proportionnel au taux d'humidité des sols (**Basilio et al., 2003**).

Tableau XIV. Isolats d'actinobactéries des différentes stations.

Station	Origine de prélèvement	Nombre d'isolats d'actinobactéries
1	Pal	91
2	Chott	20
3	Seb	1
Total		112

En Algérie, plusieurs études portant sur l'isolement des actinobactéries, la taxonomie des souches isolées et l'étude des antibiotiques secrétés, ont été réalisées (Hacène *et al.*, 1994 ; Nouasri, 1996 ; Kecha, 1996 ; Sabaou *et al.*, 1998 ; Lamari *et al.*, 2002a,b ; Zitouni *et al.*, (2004 a,b et 2005) ; Boughachiche *et al.*, 2005 ; Badji *et al.* 2006 ; Boudemagh *et al.*, 2005 ; Kitouni, 2005 ; Boudjella *et al.*, (2006 et 2010) ; Merrouche *et al.*, 2010 ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Meklat *et al.*, (2012 et 2013) ; Boubetra *et al.*, 2013 ; Toumatia *et al.*, 2014 ; Messis *et al.*, 2014,....). Ces travaux ont montré que les sols sahariens, qui représentent un écosystème particulier, renferment un potentiel assez riche en actinobactéries tant du point de vue quantitatif de biodiversité et d'activité antimicrobienne (Sabaou *et al.*, 1998). Les travaux réalisés par Zitouni *et al.* (2004 a, b et 2005) ont montré qu'une souche du genre *Saccharothrix* SA 103, sécrète plusieurs antibiotiques originaux appartenant aux familles des anthracyclines, des macrolides et des nucléotides.

D'après la **figure 16**, il apparaît que le nombre de souches d'actinobactéries isolées à partir de milieux additionnés d'antifongiques est nettement supérieur à celui des milieux sans antifongique. Il a été isolé à partir de ce milieu 55 souches d'actinobactéries de la palmeraie, 14 souches de Chott Ain Beida et une souche de sebkha de Bamendil. Le milieu sans antifongique a permis d'isoler seulement 7 souches de la palmeraie, une souche de sol de Ain Beida et aucune souche n'a été isolé de Sebkha. Il est donc évident que l'addition d'antifongique aux milieux de culture réduit la prolifération des champignons au profit des bactéries actinomycétale (Takizawa *et al.*, 1993)

Les sols ayant subit un prétraitement avec le CaCO₃ ont permis d'isoler 29 souches de la palmeraie (31,86%), 5 souches du Chott Ain Beida (25 %) et aucune de la sebkha de Bamendil (**figure 16**). On remarque donc que le nombre d'actinobactéries a considérablement augmenté dans les sols traités par rapport au sol non traités. Ces résultats concordent avec ceux de Alferova et Terekhova (1989) qui ont montré que le traitement des échantillons avec du carbonate de calcium favorise la sporulation et par conséquent augmente considérablement (jusqu'à 100 fois) le nombre des actinobactéries par rapport aux témoins non traités ; ceci s'accompagne également de la diminution de la flore fongique. A ce sujet la littérature précise que le rapport actinobactéries et autres microorganismes d'un échantillon augmente avec :

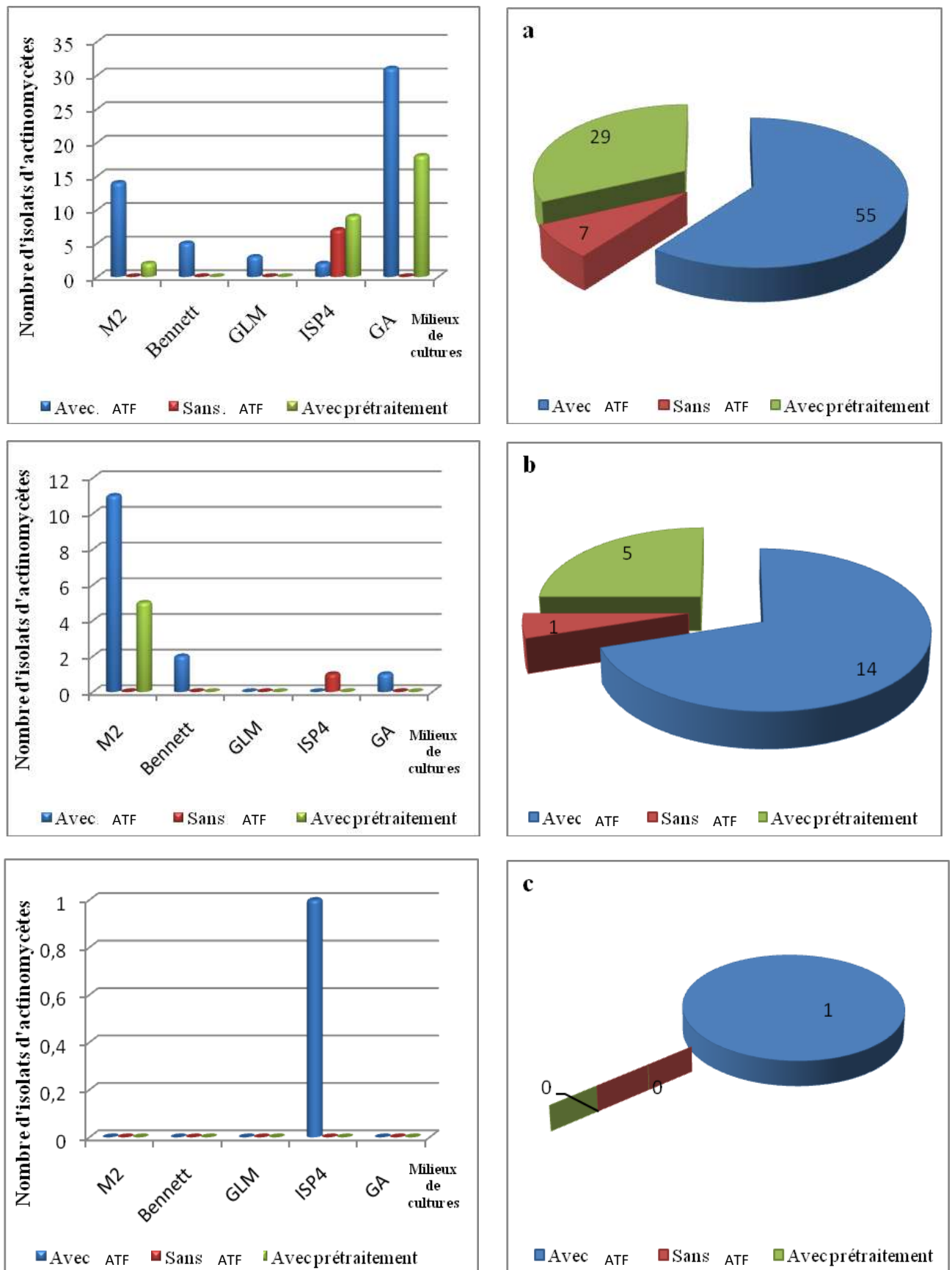


Figure 16. Répartition des isolats d'actinobactéries en fonction des traitements utilisés

a : station de palmeraie des sciences biologiques, b : Chott Ain Beida, c : Sebkhya de Bamendil, ATF : antifongique.

- Un prétraitement tel que l'addition de carbonate de calcium (**Alferova et Terekhova, 1989 ; El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**).
- Par l'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote tel que : l'amidon, chitine, glycérol, caseine, l'arginine, l'asparagine...) qui rendent le milieu moins favorable à la croissance des autres bactéries (**Cavalla et Eberlin, 1994**)
- Par l'addition d'antibiotiques qui permettent d'inhiber le développement des flores bactériennes et fongiques (**Alferova et al., 1989 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Takizawa et al., 1993**).

Malgré ces précautions, on a retrouvé des colonies de champignons qui rendent l'observation, la purification et la croissance des actinobactéries plus difficile. Cela peut être dû au fait que le spectre de l'amphotéricine B utilisée n'est pas assez large et qu'il existe des champignons résistants, d'où la nécessité d'utiliser des antifongiques à large spectre ou une combinaison d'antifongiques (**Kitouni, 2005**).

La **figure 17** montre la distribution des isolats d'actinobactéries par milieu de culture dans les trois stations d'étude. Il apparaît que le milieu glucose asparagine (GA) s'avère être le meilleur suivi des milieux M2 et ISP4 qui ont permis l'isolement de 90% des souches. Les milieux Bennett et GLM avec 7 et 3 souches respectivement représentent seulement 10%. Différents milieux d'isolements sont utilisés par **Cross (1982)**, afin d'obtenir une grande variété de microorganismes. Les milieux à base de macromolécules comme l'amidon et la caséine sont aussi recommandés pour l'isolement sélectif des actinobactéries (**Seong, 2001**). Les milieux GA, M2 et ISP4 contiennent de l'asparagine, l'amidon et la caséine. Ces composés sont dégradés par la plupart des actinobactéries et rendent le milieu particulièrement favorable à l'isolement de ces microorganismes (**Boughachiche et al., 2005**). De plus ces milieux contiennent des oligo-éléments indispensables à la croissance bactérienne (**Duchauffour, 2001**).

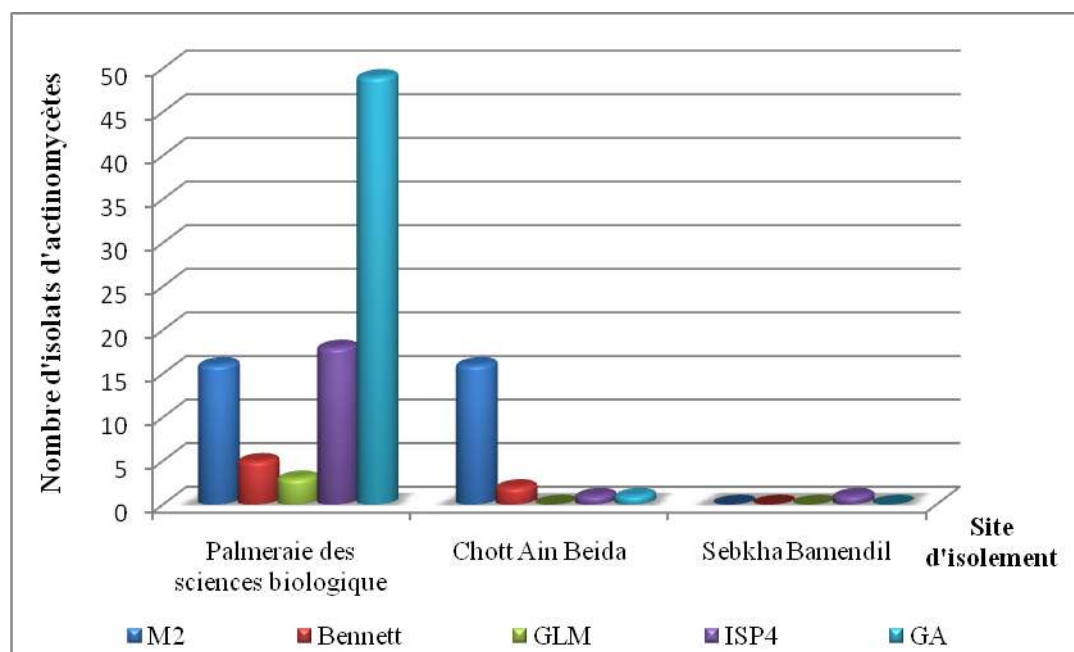


Figure 17. Distribution des isolats d'actinobactéries par milieu de culture.

3. Criblage "screening" préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats

Parmi les 112 isolats d'actinobactéries, 37 sont sélectionnés pour leurs caractéristiques culturelles spécifiques notamment pour leur croissance rapide. Ces 37 isolats ont fait objet d'un criblage de l'activité antimicrobienne sur gélose contre 16 germes cibles. Le **Tableau XV** montre que 24 isolats (65 %) présentent une activité antibactérienne et antifongique contre au moins un germe cible.

Tableau XV. Activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries sélectionnés.

Origine de prélèvement	Nombre d'isolats	Isolats actifs
Pal	19	16
Chott	17	7
Seb	1	1
Total	37	24

Le test d'activité antimicrobienne par la méthode des cylindres d'agar a permis de mettre en évidence 24 isolats actifs parmi lesquelles 15 (62,50%) présentent une activité antibactérienne, 07 isolats soit 29,16 %, présentent une activité antifongique et seulement deux isolats (8,33 %) révèlent un large spectre sur l'ensemble des germes cibles, il s'agit des

isolats **ITA1** et **I4** (**Fig. 18 et 19**). Parmi les 15 isolats présentant une activité antibactérienne, une (ITA35) est active uniquement contre *E. coli*, bactérie à Gram négatif, 8 isolats (ITA12, ITA17, ITA19, ITAY', ITA25, I20, ITAM3, ITAM2) ont montré une activité à l'égard de *S. aureus* bactérie à Gram positif et 6 isolats : ITA40, ITA38, ITA39, ITA2, BAMx, AB4, sont actives à la fois sur les Gram positif et les Gram négatif (**Tableau XVI**). Ces résultats montrent toutefois que la plus part des isolats sont plus actifs sur les bactéries à Gram positif. Ces résultats confirment ceux obtenus par **Srivibool et Sukhotiratana (2006)** qui précise également que l'absence de l'activité antibiotique vis-à-vis des bactéries à Gram négatif ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active ; mais cela peut être du à une mauvaise diffusion de celle-ci dans le milieu car n'étant pas polaire ou bien constituée de composés non polaires. Il est également probable que ces bactéries nécessitent, pour la production de certaines substances antibiotiques des milieux de culture spécifiques.

D'après les résultats obtenus, on remarque que le pourcentage des isolats à activité antifongique (29,16 %) est nettement inférieur celui des isolats à activité antibactérienne (62,50%). **Hacène et al., (1994)** montrent que 11,18 % de l'ensemble des actinobactéries isolées du Sahara algérien ont une activité antifongique. Les travaux de **Hilali et al., (2002)** montrent également lors d'un criblage initial de 85 souches d'actinobactéries isolées de plusieurs milieux naturels (sol, eaux et sédiments marins) 18 souches seulement ont présenté une activité antifongique contre *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*.

D'après **Berdy et al. (1987)**, près de 40% des antibiotiques synthétisés par l'ensemble des microorganismes possèdent une activité antifongique et plus de la moitié de ces antifongiques possèdent également des activités antibactériennes (**Berdy et al., 1987**). D'où la gamme des antibactériens qui est beaucoup plus importante que celles des antifongiques (**Di Domenico, 1999**). Ces molécules sont surtout synthétisées par des actinobactéries (**Breton et al., 1989**).

Parmi nos souches, deux isolats seulement présentent un large spectre. Des isolats de *Streptomyces* à large spectre (antibactérien et antifongique) sont souvent décrits dans la littérature (**Duraipandiyar et al., 2010 ; Thakur et al., 2007 ; Valanarasu et al., 2008 et 2009**). Certains sont même actifs contre des champignons pathogènes pour l'Homme et des bactéries multi résistantes (**Kumar et Kannabiran, 2010**) ou encore contre des larves d'insectes (**Valanarasu et al., 2010**). En Algérie, plusieurs souches de *Streptomyces* isolées à partir de sols, d'eau et d'écorces d'arbres ont montré des activités antibactériennes et antifongiques intéressantes contre divers microorganismes

pathogènes (Boughachiche *et al.*, 2005; Badji *et al.* 2005; Aouiche *et al.*, 2012; Toumatia *et al.*, 2014, Messis, 2015...etc.).

Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus sont variables, l'activité la plus faible est obtenue avec la souche ITAM2 avec un diamètre de 8 mm contre *S. aureus* et la plus élevée est observée avec la souche ITA avec un diamètre de 32 mm contre *Bacillus subtilis*. Boughachiche *et al.* (2005) ; Boudemagh *et al.* (2005), expliquent que les variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche d'actinobactérie peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes avec différents modes d'action selon la composition du milieu de culture.

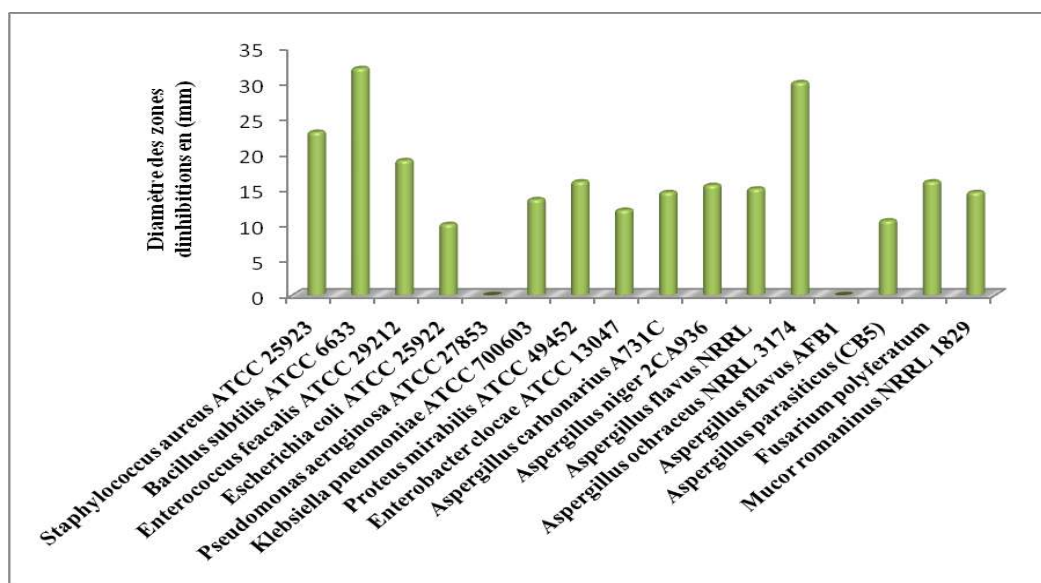


Figure 18. Activité antimicrobienne de la souche ITA1.

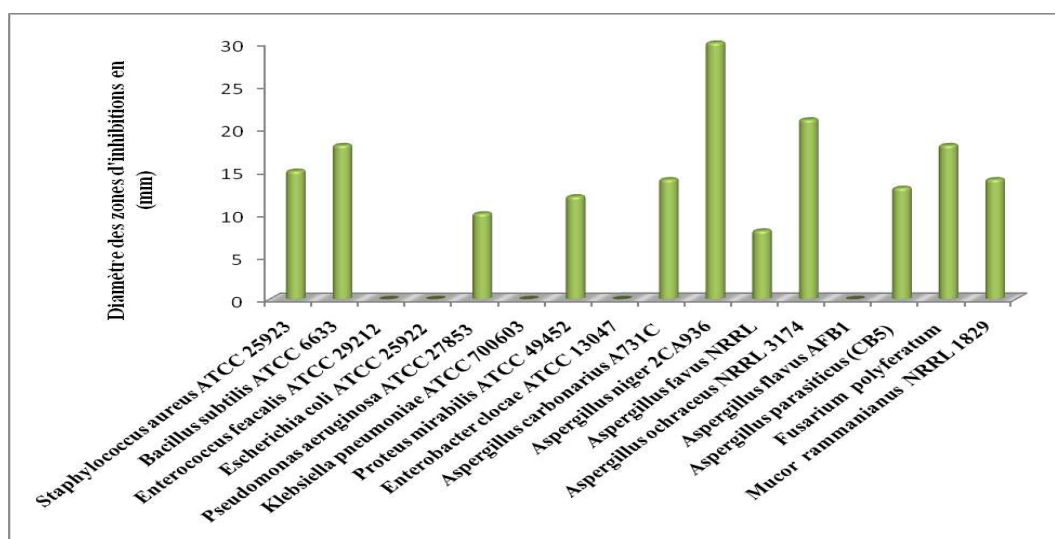


Figure 19. Activité antimicrobienne de la souche I4.

Les deux isolats ITA1 et I4 ont été sélectionnés pour la suite de l'étude.

Tableau XVI. Profils antimicrobiens des isolats d'actinobactéries sélectionnés (Diamètre des zones d'inhibition en mm).

Souches test	Microorganismes cibles															
	Bactéries								champignons							
	Gram positif				Gram négatif											
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 49452	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	<i>Aspergillus carbonarius</i> A731C	<i>Aspergillus niger</i> 2CA936	<i>Aspergillus favus</i> NRRL	<i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 3174	<i>Aspergillus flavus</i> AFB1	<i>Aspergillus parasiticus</i> (CB5)	<i>Fusarium polyferatum</i>	<i>Mucor rammanianus</i> NRRL 1829
ITA35				13												
ITA40	10		11	16		12		11								
ITA38	18							9								
ITA39	12			10				9								
ITA12	23															
ITA17	23															
ITA19	21															
ITA2	13		10	10				12								
BAMx	12		12	9				12								
AB4	15		10	10				12								
ITAY'	15															
ITA25	24															
I20	10															
ITAM3	12															
ITAM2	8															
ITA1	23	32	19	10		13,5	16	12	14,5	15,5	15	30		10,5	16	14,5
I4	15	18			10		12		14	30	08	21		13	18	14
IGATP											20		11		22	
AB5											17	17	17		16	
AB19									20							
AB27									16							
AB26									21	16				10	20	17
AB24									18	15	18	17	16		22	21
AB21									17	16	11	20		10	25	22

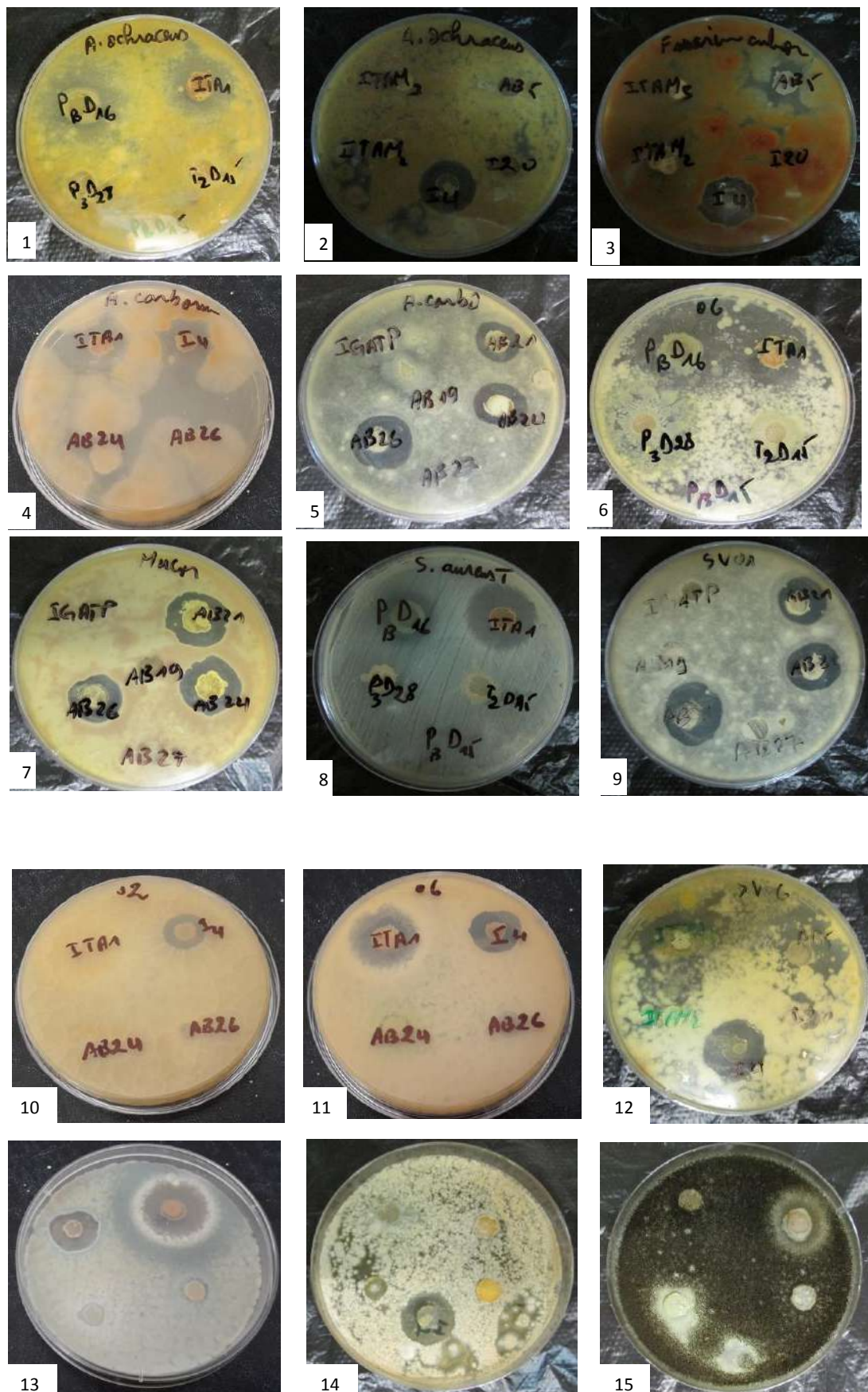


Figure 20. Activité antimicrobienne de quelques isolats d'actinobactéries sur milieu solide.

1,2 : *A. ochraceus* ; 3 : *F. culmorum*, 4,5 : *A. carbonarius*, 6, 12, 14 : *A. parasiticus*; 7 : *Mucor romanianus* ; 8 : *S. aureus* ; 9, 15 : *A. niger* ; 10, 11,13 : *A. flavus* (NRRL, AFB1).

4. Taxonomie des souches sélectionnées

Les isolats d'actinobactéries sélectionnées ITA1 et I4, ont fait l'objet d'une étude taxonomique.

4.1. Caractères morphologiques

Les caractères culturels des deux isolats sélectionnés ITA1 et I4 sur les différents milieux de culture sont consignés dans le **tableau XVII**.

L'isolat ITA1 présente une bonne croissance sur les milieux ISP5, ISP6, moyenne sur les milieux ISP2, ISP4 et GYEA, faible sur les milieux ISP1, ISP7 et nulle sur ISP3. La sporulation est bonne sur ISP5, faible sur ISP1 et GYEA et inexistante sur les autres milieux. Les colonies de l'isolat ITA1 présentent un aspect poudreux sec sur les différents milieux de culture avec un diamètre qui varie de 1 à 3mm, d'une couleur blanche à rose poudré selon le milieu. Le mycélium aérien est de couleur rose blanchâtre, celle du substrat varie selon le milieu. Aucun pigment diffusible n'a été observé sur les milieux de cultures utilisés.

La souche I4 présente une croissance abondante sur les milieux ISP2, ISP3 et ISP6, moyenne sur ISP4 et ISP5 et faible sur ISP1, ISP7 et GYEA. La sporulation est abondante sur ISP2 et ISP3, moyenne sur ISP4, faible sur ISP5 et nulle sur les autres milieux. Les colonies de l'isolat I4 présentent un aspect cotonneux, sec et rugueux selon le milieu avec un diamètre de 1 à 5 mm d'une couleur blanche à grise. Le mycélium aérien est de couleur gris, celui de substrat est marron. Les pigments solubles ne sont produits sur aucun des milieux.

Les observations microscopiques effectuées sur les isolats ITA1 et I4 sont présentées dans la **figure 21**.

L'isolat ITA1 est constitué d'un mycélium aérien de type *RA* (*Retinaculum Apertum* : chaînes en crochets ou en boucles), ramifié. Le mycélium de substrat est très dense et se présente sous forme de filaments épais (**Fig. 37**).

L'isolat I4 possède un mycélium de substrat très dense et épais. Il est constitué de filaments ramifiés non fragmentés, chapeauté par un mycélium aérien produisant des chaînes de spores en spirales de type *S*.

Tableau XVII. Caractéristiques macromorphologiques des isolats **ITA1** et **I4** (7 jours).

Isolat	Milieux de culture	Caractères culturaux			Croissance	Sporulation
		MA	MS	PS		
ITA1	ISP1	Blanc	Jaune clair	-	+	+
	ISP2	Rose blanchâtre	Marron	-	++	-
	ISP3	-	-	-	-	-
	ISP4	Rose blanchâtre	Marron clair	-	++	-
	ISP5	Blanc	Jaune clair	-	+++	+++
	ISP6	Rose	Marron	-	+++	-
	ISP7	Rose blanchâtre	Marron clair	-	+	-
	GYEA	Rose blanchâtre	Jaune clair	-	++	+
I4	ISP1	Gris	Marron	-	+	-
	ISP2	Gris blanchâtre	Marron	-	++++	++++
	ISP3	Gris foncé	-	-	++++	++++
	ISP4	Gris verdâtre	Jaune clair	-	++	++
	ISP5	Blanc	Marron clair	-	++	+
	ISP6	Gris	Marron rougeâtre	-	++++	-
	ISP7	Marron clair	Marron clair	-	+	-
	GYEA	Jaune clair	Jaune clair	-	+	-

MA : mycélium aérien; MS : mycélium du substrat; PS : pigment soluble

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

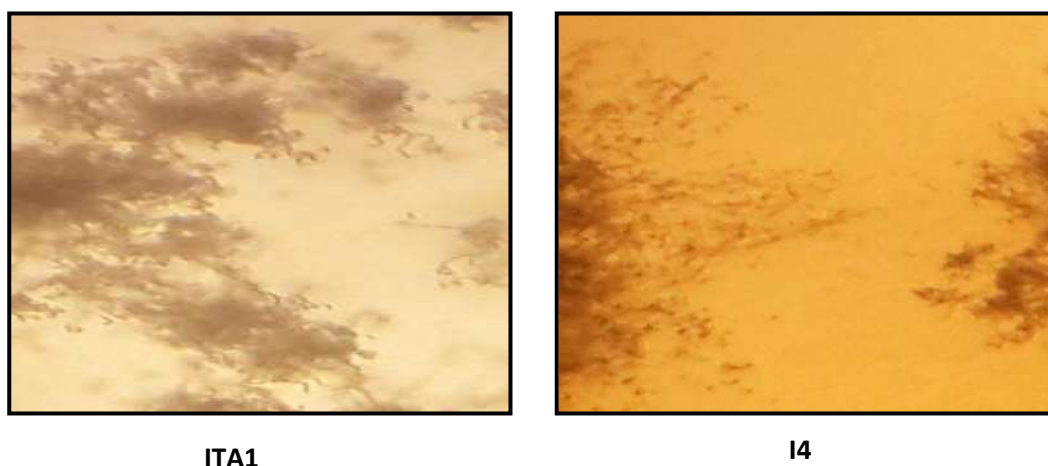


Figure 21. Aspect microscopique du mycélium aérien des isolats **ITA1** et **I4** vu au microscope optique (Optika) au grossissement ($\times 10$).

L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des souches d'actinobactéries est largement utilisée pour caractériser les genres des

actinobactéries. Selon **Shirling et Gottlieb (1966)**, l'identification des actinobactéries repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinobactéries (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*...) peuvent être identifiés avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (**Williams et al., 1993**).

Sur la base des observations macroscopiques (croissance, aspect et coloration) et microscopiques, les deux isolats montrent les traits typiques liés aux *Streptomycètes*, ce qui laisse supposer leur appartenance à ce genre. En effet D'après **Locci et al., (1989)** cités par **Thakur et al., (2007)**, les souches présentant une croissance sur une large gamme de milieux de culture montrent généralement une morphologie typique des *Streptomycètes*.

Les travaux menés par **Muiru et ses collaborateurs en 2008** stipulent que les milieux de culture utilisés pour l'identification des actinobactéries n'ont pas d'impact sur les caractères morphologiques, mais plutôt sur les caractéristiques physiologiques comme la production de pigments mélanoides. En plus des caractères morphologiques, les caractères biochimiques et physiologiques sont d'une grande importance dans la caractérisation des genres d'actinobactéries.

4.2. Analyse des constituants pariétaux

Le **tableau XVIII** révèle l'analyse en acides aminés et en glucides des isolats ITA1 et I4. Les résultats montrent la présence de l'isomère LL de l'acide diamino pimélique au niveau de paroi d'ITA1 et I4, la lysine au niveau de paroi d'ITA1 et la glycine au niveau d'I4. L'analyse des sucres cellulaires n'a révélé la présence d'aucun sucre caractéristique à savoir : xylose, arabinose, galactose et rhamnose.

Ces résultats démontrent que les isolats ITA1 et I4 correspondent au chimiotypage IC selon **Lechevalier et Lechevalier (1970b)** et **Labeda et Kroppensted (2000)**.

Les résultats obtenus à ce niveau avec les caractéristiques morphologiques et chimiotaxonomiques permettent de rattacher les isolats ITA1 et I4 au genre *Streptomyces*.

Les données de l'étude chimique que nous avons obtenu, ont été rapportées par d'autres auteurs à savoir **Al-Taïet et al., (1999)**, **Dastager et al., (2007)**, qui ont démontré la présence de l'isomère LL de l'acide diamino pimélique, la présence de glycine et l'absence des sucres caractéristiques dans la paroi de la nouvelle bactérie de *Streptomyces gulbargensis*

sp. nov. et *Streptomyces malaysiensis sp. nov.* respectivement. De même **Wu et al., (2001)** ont montré la présence dans le peptidoglycane l'isomère LL-DAP et l'absence de sucres.

Tableau XVIII. Analyse des acides aminés et sucres des isolats ITA1 et I4.

Constituants cellulaires	révélateurs	Couleur des taches	Rapport frontal (RF)	Identification du composé cellulaire
Acides aminés ITA1	Ninhydrine	S ₁ : Tache orange	Rf= 0,65	Acide LL-diaminopimélique
		S ₂ : Tache orange	Rf= 0,68	lysine
		S ₃ : Tache orange	Rf= 0,3	ND
Sucres ITA1	Diphenylamine-aniline	S ₁ : Tache rose	Rf= 0,05	ND
Acides aminés I4	Ninhydrine	S ₁ : Tache violette	Rf= 0,65	Acide LL-diaminopimélique
		S ₂ : Tache rose violet	Rf=0,82	Glycine
Sucres I4	Diphenylamine-aniline	S ₁ : Tache bleu	Rf= 0,15	ND
		S ₂ : Tache bleu	Rf= 0,19	ND

ND : non déterminé.

4.3. Caractères physiologiques

Les résultats des caractères physiologiques sont résumés dans le **tableau XIX**.

Tableau XIX. Caractéristiques physiologiques des souches ITA1 et I4.

Propriétés	ITA1	I4
Catalase	+	+
Pigment mélanique	-	-
Amidon	+	+
Caséine de lait	+	-
Tyrosine	-	-
Tween 80	-	+
Assimilation des sucres :		
glucose	+	+
arabinose	+	-
fructose	+	+
cellobiose	+	+
galactose	+	+
lactose	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
ribose	+	-
rhamnose	+	+
xylose	+	+
mannose	+	+
Assimilation des acides organique :		
Citrate de sodium	+	+
Benzoate de sodium	+	-
Acétate de sodium	+	+
Pyruvate de sodium	+	+
Oxalate de sodium	+	+
Lactate de sodium	+	+
Croissance en présence de NaCl:		
5%	+++	+++
8%	+++	++
11%	++	++
15%	++	+
Croissance à T °C :		
10°C	++	+
15°C	++	+
20°C	++	++
25°C	+++	+++
30°C	++++	++++
35°C	+++	+
40°C	++	-
45°C	+	-
50°C	-	-
Croissance à pH :		
5	+	+
6	+++	+++
7	++++	++++
8	+++	+++
9	++	++
10	++	+
Lysine	+	+
Histidine	+	+
Arginine	+	+

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

L'isolat ITA1

La souche ITA1 dégrade de nombreux composés organiques à savoir l'amidon, la caséine, le citrate, le benzoate, l'acétate, le pyruvate, l'oxalate et lactate de sodium mais elle ne dégrade pas la tyrosine et le tween 80. La souche utilise tous les composés glucidiques comme seules sources de carbone, la lysine, l'histidine et l'arginine comme seules sources d'azote. La souche ITA1 est capable à croître dans un large interval de température compris entre 10 °C et 45°C ; elle peut aussi croître à un pH de 5 à 10 et à une concentration en NaCl comprise entre de 5% à 15%.

L'isolat I4

La souche I4 peut dégrader une grande variété de composés organiques tel que l'amidon, le tween 80, le citrate, l'acétate, la pyruvate, l'oxalate et lactate de sodium mais elle ne dégrade pas la caséine de lait, la tyrosine et benzoate de sodium. Elle est capable d'utiliser la plupart des composés glucidiques comme seules sources de carbone à l'exception d'arabinose et de ribose. Elle croît à une température optimale de 28 °C et un pH 7 mais elle ne peut pas croître à des températures supérieures à 35°C. La souche I4 peut croître à des concentrations en NaCl de 5% à 15%, comme elle utilise la lysine, l'histidine et l'arginine comme seule source d'azote.

4.4. Identification moléculaire

Elle a été réalisée uniquement pour l'isolat **ITA1**. L'étude moléculaire est effectuée au niveau de l'Institut Pasteur, Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), Pôle d'Identification Bactérienne (PIB) de Paris (FRANCE). Le choix de cet isolat a été fait essentiellement sur la base de l'activité antibactérienne, du spectre d'activité ainsi qu'en raison de sa micromorphologie particulière. Le séquençage de son gène *rrs* codant l'ARNr 16S a permis de rapprocher phylogénétiquement l'isolat ITA1 à l'espèce *S. fradiae* (**Figure 22**).

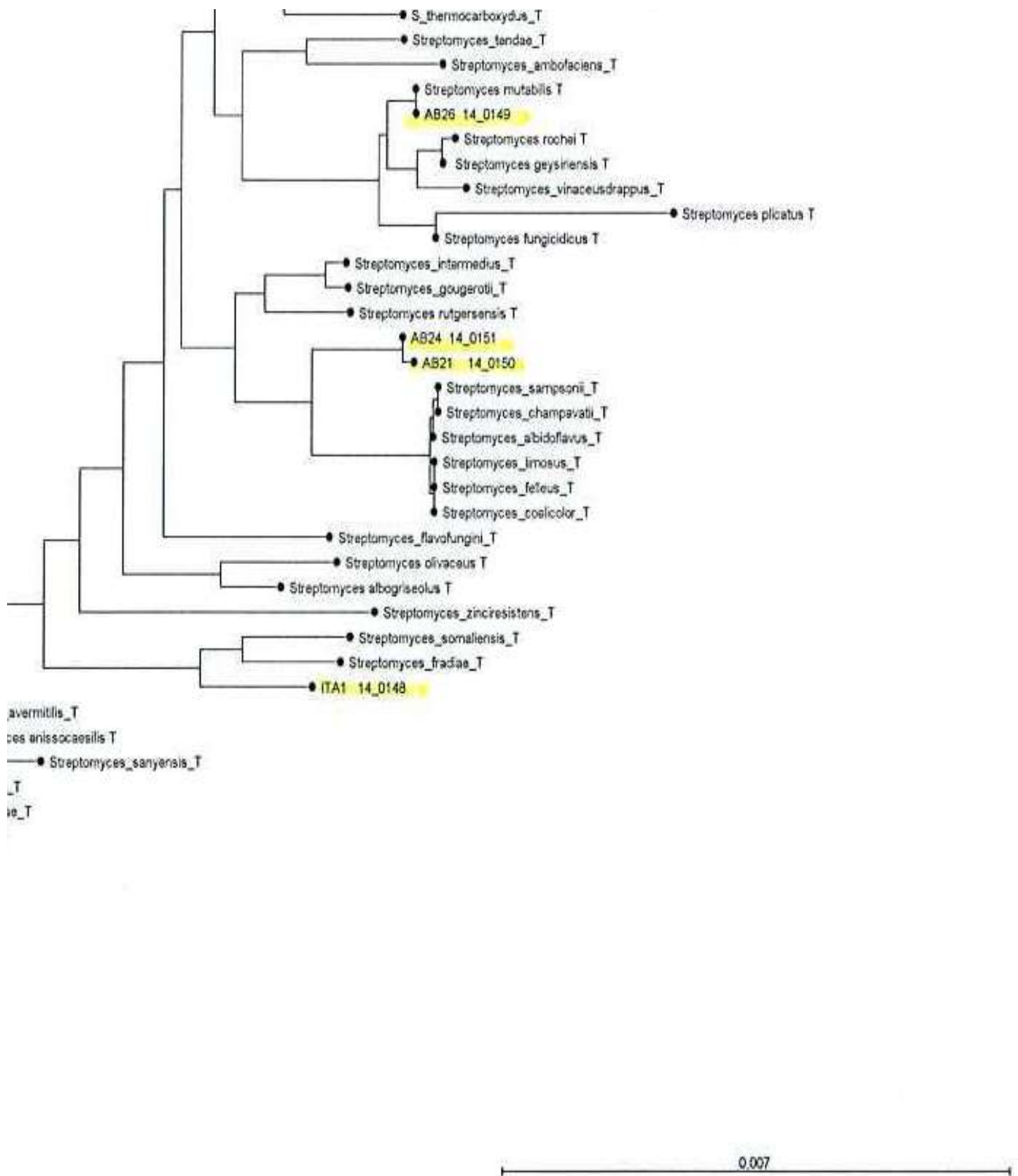


Figure 22. Arbre phylogénétique réalisé sur la base de séquences d'ADNr 16S montrant les relations entre les isolats sélectionnés et les différentes espèces de *Streptomyces*.

5. Cinétique de croissance et production d'antibiotiques

Les cinétiques de croissance, de production des antibiotiques et de l'évolution du pH de la souche ITA1 sont illustrées dans la **figure 23**. Les cultures sont réalisées dans le milieu de Bennet liquide pendant 10 jours

• Croissance

La cinétique de croissance de la souche ITA1 révèle deux phases, La première entre le 1^{er} et le 4^{ème} jour d'incubation qui comprend une phase de croissance rapide du 1^{er} au 2^{ème} jour, atteignant une biomasse de 4 g/l, une phase de ralentissement du 2^{ème} au 3^{ème} jour puis une phase stationnaire du 3^{ème} au 4^{ème} jour avec un poids sec de 6g/l. Une seconde phase exponentielle est observée à partir du 4^{ème} jour, avec une croissance maximale du 4^{ème} au 5^{ème} jour qui atteint les 10g/l suivie immédiatement d'une phase de déclin jusqu'au 10^{ème} jour d'incubation où le poids sec diminue à 4g/l. A partir du 8^{ème} jour, on observe une légère reprise de croissance dite croissance cryptique. Cette dernière a été remarquée chez plusieurs microorganismes ; elle s'explique par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes lysées durant la phase de déclin (**Prescott et al., 2013**).

La cinétique de croissance, la production d'antibiotiques et de l'évolution du pH, de la souche I4 effectuée sur le milieu M2 liquide pendant 10 jours, sont illustrés dans la **figure 24**.

Pour cette souche, la cinétique de croissance révèle une croissance rapide atteignant 1,9 g/l au 4^{ème} jour puis la biomasse augmente progressivement pour atteindre un maximum au 5^{ème} jour avec 2,86 g/l. La cinétique montre également deux étapes, la première est comprise entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour avec une croissance de 1^{er} au 2^{ème} jour et une stabilisation du 2^{ème} au 3^{ème}. Une seconde étape est observée à partir du 3^{ème} jour qui comprend une autre phase croissance du 3^{ème} au 5^{ème} jour où la biomasse est maximale à 2,86 g/l puis une phase de déclin du 5^{ème} au 10^{ème} jour avec une diminution progressive du poids jusqu'à la fin d'incubation.

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

La cinétique de croissance révèle en fait deux phases exponentielles pour les deux souches ITA1 et I4 qui s'explique par le phénomène de diauxie. La première après un jour d'incubation est marquée par une légère acidification du milieu de culture et qui peut être expliquée par une libération d'acides organiques, Il se pourrait que le phénomène de diauxie

observé pour la souche ITA1 soit dû également à la consommation précoce des acides aminés de l'extrait de levure ajouté au milieu et que le glucose ne soit consommé en tant que source de carbone qu'au cours de la seconde phase exponentielle. Ce phénomène est généralement observé dans les milieux comportant deux sources de carbone osidique, le glucose et le lactose ou galactose ou xylose (**Prescott et al., 2013; Euzéby, 2010**). Cependant, il peut également se manifester parfois dans des cultures avec une seule source osidique et une source azotée.

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs sur la croissance en diauxie des souches de *Streptomyces* tel que **Driche (2010)** ; **Aouiche et al. (2012)** ; **Toumatia et al. (2014)**, ainsi que d'autres souches d'actinobactéries à savoir *Saccharothrix algeriensis* (**Strub, 2008**).

D'autre part, le glucose, source de carbone rapidement assimilable est connue comme étant un excellent stimulant de la croissance microbienne (**Hermans et al., 1989**) et sa concentration est déterminante pour la production d'antibiotiques. En effet, pour de nombreux microorganismes à concentration élevée, il exerce une action négative sur la synthèse d'antibiotiques due à la répression catabolique glucidique ou effet glucose. **Larpent et Sanglier, (1989)** rapportent que les fortes concentrations de glucose ou d'autres sources carbonées facilement assimilables sont généralement défavorables à la production.

L'absence de la phase de latence observée pour les deux souches est due au fait que les pré-cultures sont jeunes et préparées dans le même milieu.

- **pH**

L'évolution du pH pour la souche ITA1 montre une diminution du pH initial à 6 au 2^{ème} jour d'incubation puis il augmente à 8^{ème} au 5^{ème} jour avec une alcalinisation progressive du milieu jusqu'au dixième jour avec un pH 8,4 à la fin d'incubation (**figure 23**). Pour la souche I4, le pH initial de 7,2 diminue à 6,8 au 2^{ème} jour d'incubation puis augmente à 8,2 au sixième jour avant d'entamer une baisse jusqu'à 6,2 à la fin d'incubation (**figure 24**).

Cette évolution du pH serait due à la dégradation des sources azotées organiques tels que les acides aminés présents dans l'extrait de levure, qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier alcalinise le milieu (**Strub, 2008**).

La production de métabolites secondaires tels que les antibiotiques est stimulée ou inhibée par des variations de pH. **Augustine et al., 2005** ; **Asanza-Teruel et al., 1997** rapportent que chez *Streptomyces aureofaciens*, la variation du pH pendant la fermentation peut modifier l'équilibre entre la production de la chlorotétracycline et de la tétracycline dans le

milieu de culture. Selon **Smaoui (2010)**, un pH acide favorise la production de chlorotétracycline alors que le pH basique favorise la sécrétion de tétracycline.

- **Production d'antibiotiques**

L'activité antibactérienne et antifongique de nos deux isolats vis-à-vis de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *A. ochraceus* ATCC 3174 et *A.niger* 2CA936 détectée par la méthode des puits est illustrée dans les **figures 23 et 24**.

Concernant la souche ITA1, la production de métabolites antimicrobiens apparait à partir du deuxième jour d'incubation. Elle présente deux maxima d'activité au 2^{ème} et 3^{ème} jour et au 5^{ème} et 6^{ème} jour sur *Bacillus subtilis* avec une zone d'inhibition de 18 mm de diamètre

L'activité antifongique est maximale au 4^{ème} et 5^{ème} jour avec une zone d'inhibition de 19 mm de diamètre. Les productions maximales d'antibactériens et antifongiques par la souche ITA1 coïncident avec la fin de la phase exponentielle et le début de la phase de déclin comme c'est le cas pour la majorité des microorganismes. Ces résultats corroborent ceux de **Sejiny (1991)** qui ont montré que l'activité antibactérienne des souches *Streptomyces* spp. est accrue à partir du sixième jour d'incubation.

Une autre production d'antibiotiques pour la souche ITA1 a lieu vers la fin de l'incubation durant la croissance cryptique (**figure 22**) ; des résultats similaires ont été retrouvés par **Toumatia (2015)** avec une souche de *Streptomyces mutabilis*.

Les cinétiques des activités antibactériennes présentent plusieurs maxima surtout pour la souche ITA1, cela suggère la production de plusieurs antibiotiques ou complexes d'antibiotiques qui seraient soit des dérivés proches soit des groupes d'antibiotiques différents ou encore à spectres d'activité probablement différents (**Toumatia, 2015**).

Concernant la souche I4 L'activité antifongique est détectée vis-à-vis d'*Aspergillus Niger* 2CA936 et *Aspergillus ochraceus* ATCC NRRL 3174 par la méthode des puits. La production des métabolites antimicrobiens apparait à partir du 4^{ème} jour d'incubation. Elle est maximale au cinquième jour avec des zones d'inhibition de 22 mm et 15,5 mm de diamètre vis-à-vis *Aspergillus Niger* et *Aspergillus ochraceus* respectivement c'est-à-dire au cours de la phase exponentielle.

La production de métabolites secondaires par les microorganismes a lieu généralement durant les phases de ralentissement et stationnaire mais dans le cas des actinobactéries cette production peut débuter même en phase exponentielle (**Zitouni, 2005 ; Badji, 2006**), ou même à la phase de déclin (**Aouiche, 2012**).

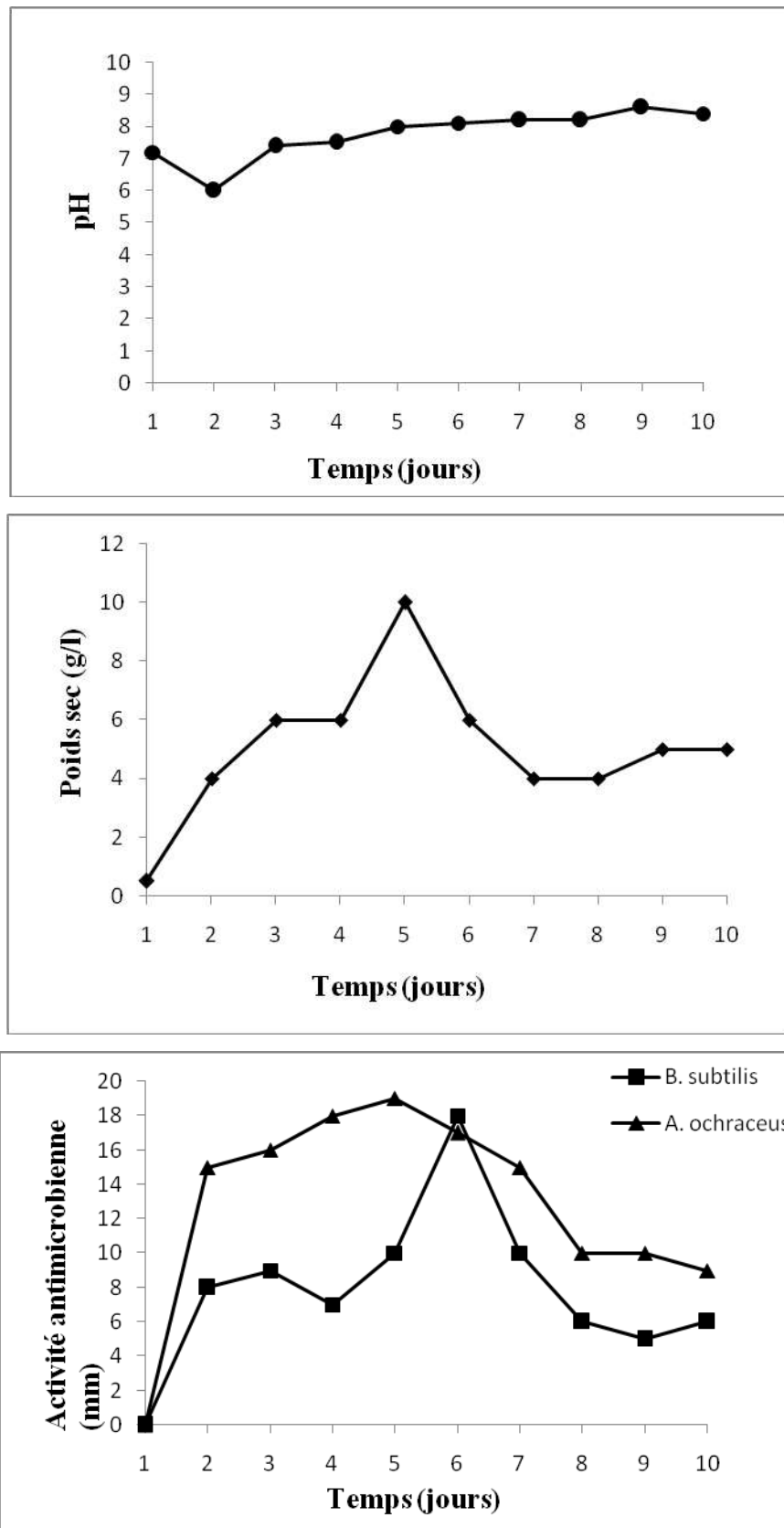


Figure 23. Cinétique de croissance, évolution de l'activité et du pH de la souche ITA1 sur le milieu Bennett contre *B. subtilis* ATCC 6633 et *A. ochraceus* ATCC NRRL 3174.

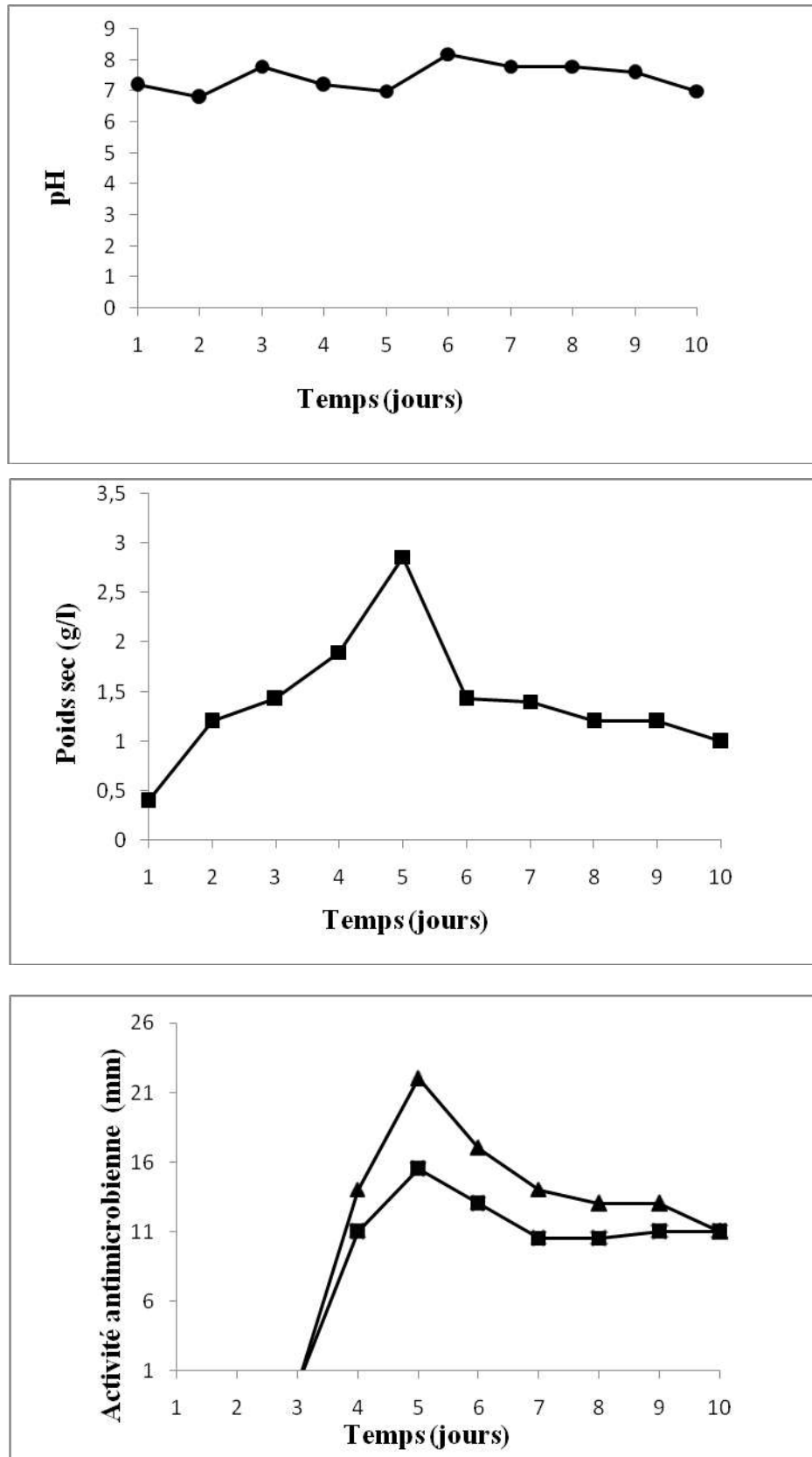


Figure 24. Cinétique de croissance, évolution de l'activité et du pH de la souche I4 sur le milieu M2 vis-à-vis *A. Niger* 2CA936 et *A. ochraceus* ATCC NRRL 3174.

6. Optimisation des paramètres de culture pour la production d'antibiotiques par « Response Surface Methodology –RSM- »

Souche I4 dans le milieu M2

Le tableau XX montre les résultats de l'expérience RSM avec l'effet de trois variables indépendantes dans le milieu M2: caséine, amidon et le NaCl. Les maxima et minima des variables générées par le RSM sont représentés par le total des cinq points centraux mis en place aux essais n° 2, 6, 9, 10 et 13. Des activités antibactériennes similaires sont également observées. Toutefois, la production maximale anticipée est atteinte à l'essai n°. 10 avec 0,2 g / l de caséine, 14 g / l d'amidon et 2 g / l de NaCl, alors que la production antibactérienne minimale est observée dans l'essai n°. 13 avec une quantité d'amidon de l'ordre de 6 g / l, 0,3 g / l de caséine et 3 g / l de NaCl.

Tableau XX. Conception expérimentale et résultats du RSM pour la production d'antibiotique à partir de *Streptomyces sp.* I4 sur le Milieu M2.

RunOrder	Block	Caséine (g)	Amidon (g)	NaCl (g)	Y obsrevé (mm)	Y predicted (mm)	Y residual (mm)
1	1	0,3	10	2	20	19,000	1,000
2	1	0,2	10	1	22	22,375	-0,375
3	1	0,2	6	2	21	20,000	1,000
4	1	0,3	10	2	22	19,000	3,000
5	1	0,4	6	2	24	23,750	0,250
6	1	0,2	10	3	20	20,375	-0,375
7	1	0,4	14	2	17	18,000	-1,000
8	1	0,3	14	3	27	26,375	0,625
9	1	0,3	6	1	25	25,625	-0,625
10	1	0,2	14	2	30	30,250	-0,250
11	1	0,3	10	2	15	19,000	-4,000
12	1	0,4	10	1	18	17,625	0,375
13	1	0,3	6	3	11	11,625	-0,625
14	1	0,4	10	3	17	16,625	0,375
15	1	0,3	14	1	16	15,375	0,625

La signification statistique du modèle assemblé est évaluée par l'analyse de la variance ANOVA (**tableau XXI**).

Le plan est valide puisque P -value (valeur P) du modèle est inférieure à celle de Lack-of-fit (**tableau XXI**). L'analyse des paramètres linéaires indique que les variables indépendantes n'ont pas un effet significatif c'est-à-dire, il n'y a pas une influence de ces paramètres sur l'activité antibactérienne. Il en est de même pour l'interaction entre les paramètres quadratiques "Square", les P -value sont supérieures à

0.05. Par contre pour les interactions entre deux paramètres (Way Interaction), on observe une influence significative sur l'activité antibactérienne puisque P -value < 0.05, hormis l'interaction entre caseine et NaCl, ou P -value > 0.05.

La qualité de l'information est confirmée par le coefficient de détermination " R^2 ". qui est de 0,9114 et qui révèle une réponse de modèle très satisfaisante (proche de 1) et qui peut expliquer 91,14% des variations totales (**Tableau XXI**). La valeur de l'ajustement représentée par le coefficient de détermination ($AdjR^2$) est également suffisamment élevée (0,75), cela indique un modèle significatif à 75,19%,

La conception à l'erreur de prédiction moyenne (Error) (**Tableau XXI**), les ratios supérieurs à quatre indiquent une discrimination de modèle adéquate, et d'après le tableau la valeur est supérieure à 4, donc la discrimination est adéquate.

Tableau XXI. Analyse de la variance du modèle quadratique ajusté (Régression de surface de réponse: Activité antibactérienne par rapport à la caséine; Amidon; NaCl).

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	311,083	34,565	5,71	0,035
Linear	3	0,750	16,917	2,80	0,148
Caseine	1	36,125	36,125	5,97	0,058
Amidon	1	10,125	10,125	1,67	0,252
NaCl	1	4,500	4,500	0,74	0,428
Square	3	39,833	13,278	2,19	0,207
Caseine*Caseine	1	11,308	11,308	1,87	0,230
Amidon*Amidon	1	18,692	18,692	3,09	0,139
NaCl*NaCl	1	8,308	8,308	1,37	0,294
2-Way Interaction	3	220,500	73,500	12,15	0,010
Caseine*Amidon	1	64,000	64,000	10,58	0,023
Caseine*NaCl	1	0,250	0,250	0,04	0,847
Amidon*NaCl	1	156,250	156,250	25,83	0,004
Error	5	30,250	6,050		
Lack-of-Fit	3	4,250	1,417	0,11	0,947
Pure Error	2	26,000	13,000		
Total	14	341,333			

DF : Degrees of freedom, SS : Sum of Squares, Ms : Mean Sum of squares, adj : ajustement.
S = 2,45967, PRESS = 126,5, R-Sq = 91,14% , R-Sq(pred) = 62,94%, R-Sq(adj) = 75,19%

Surface de réponse et parcelles de contour

Les surfaces de réponse sont utilisées pour déterminer l'interaction des composants moyens et les optima ayant l'effet le plus significatif sur la production d'antibiotiques. Les parcelles de contour 2D (**figure 25 A1, B1 et C1**) et de surface de réponse tridimensionnelle (3D) (**figure 25 A2, B2 et C2**) décrites par le modèle de régression sont obtenues avec l'aide du design Box-Behnken et ont été dessinées pour illustrer les effets des deux variables

indépendantes à la fois maintien de la troisième variable à un niveau fixe (zéro). Ces interactions indiquent une excellente adéquation du modèle et ont aidé à comprendre à la fois les effets principaux et les effets d'interaction de ces variables.

Pour les parcelles de contour 2D, la valeur prédite maximale est indiquée par la face définie dans la plus petite ellipse du diagramme de contour (surface la plus foncée).

Les **figure 25 (A1 et A2)** montrent l'effet de la caséine et du NaCl sur l'activité antibactérienne. D'après le **tableau XXI** d'ANOVA on remarque que la valeur de *P*-value est supérieure à 0.05, donc pas d'interaction entre ces deux paramètres, cela apparait dans la **figure 25 A1**.

Les **figures 25 (B1 et B2)** montrent l'effet de la caséine et de l'amidon sur l'activité antibactérienne. Par ailleurs d'après les données d'interaction, le tracé du contour montre que:

- Les zones de contour représentent des réponses constantes, qui correspondent aux activités de 20, 22.5, 25, 27.5 et 30 mm
- Le contour avec la couleur verte la plus foncée dans le coin supérieur gauche indique le contour où l'activité est la plus élevée (>30mm).
- D'après la **figure 25 B1**, on observe que l'activité augmente lorsqu'on se déplace du centre vers le coin supérieur droit, en d'autres termes l'activité augmente lorsqu'on réduit simultanément la caséine et on augmente l'amidon ; cela suggère qu'on peut maximiser l'activité à une concentration de caséine légèrement inférieure à 0,24 g/l et une concentration d'amidon supérieure à 13 g/l.

La même tendance est observée dans les effets de l'amidon et du NaCl sur l'activité antibactérienne, **les figures 25 C1 et C2 montrent que :**

- Les zones de contour représentent des réponses constantes qui correspondent aux activités de 12, 15, 18, 21 et 24.
- Le contour avec la couleur verte la plus foncée dans le coin supérieur droit et le coin inférieur gauche indiquent les contours où l'activité est la plus élevée (>24) (**figure 25 C1**).
- D'après la **figure 25 C1**, on observe que l'activité augmente lorsqu'on se déplace vers le coin inférieur droit ou vers le coin supérieur gauche, en d'autres termes l'activité augmente lorsqu'on réduit simultanément l'amidon et le NaCl ou on augmente leur concentration, cela suggère qu'on peut maximiser l'activité à une concentration minimale d'amidon et de NaCl inférieure à 6,5 g/l et 1,5 g/l respectivement ou maximale supérieure à 13 g/l et 2,2 g/l respectivement.

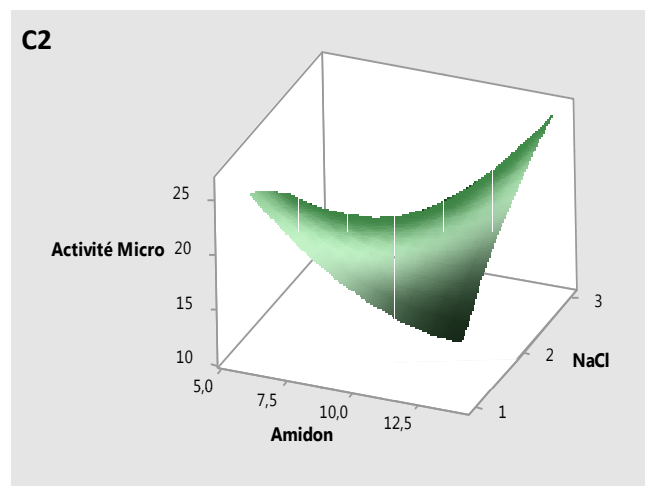
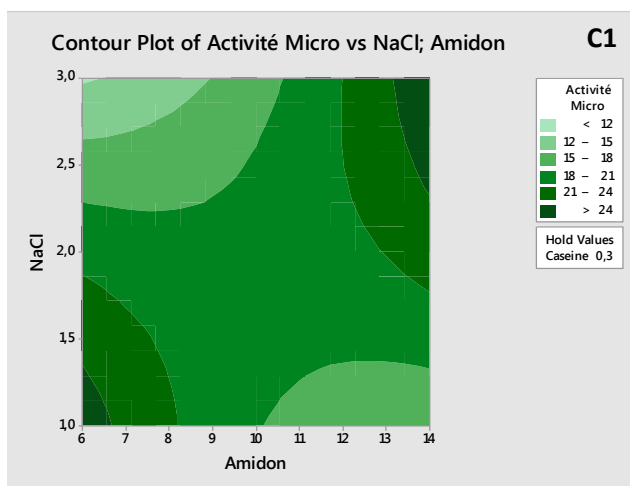
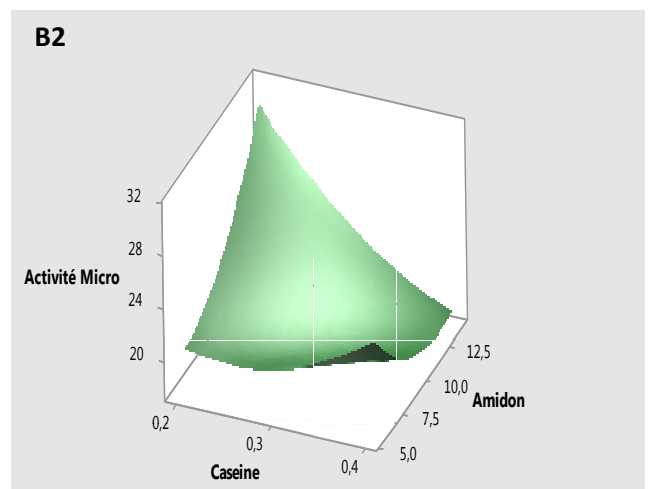
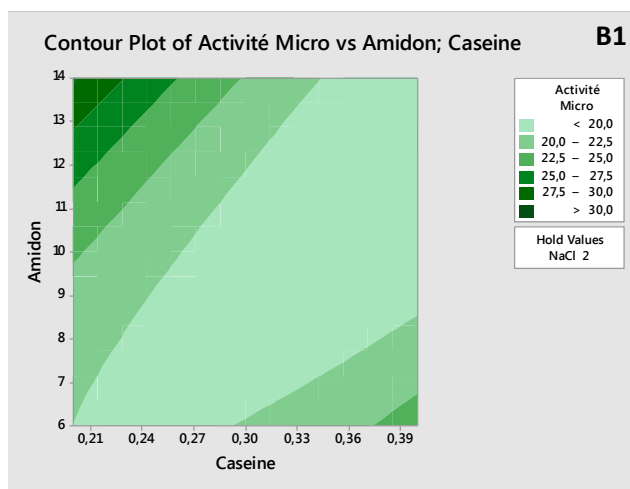
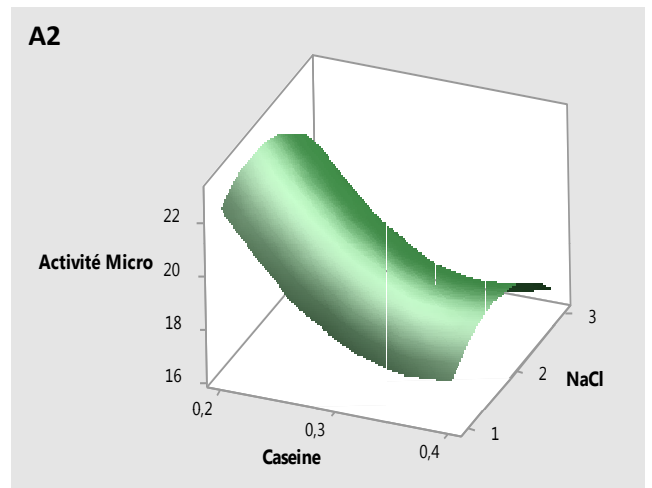
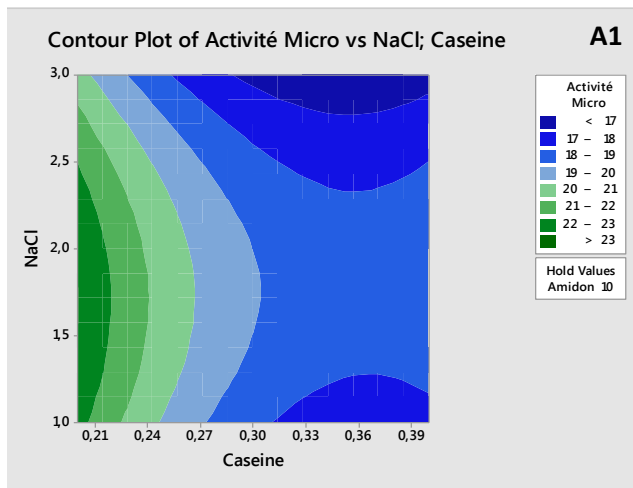


Figure 25. Surface de réponse et parcelles de contour correspondant à l'activité antibactérienne de la souche *Streptomyces sp.* I4 en relation avec l'amidon, caseine et NaCl.

(A1, B1 et C1 : parcelles de contour 2D des paramètres ; A2, B2 et C2 : surfaces de réponse 3D des paramètres).

Avec l'aide de l'optimisation numérique, le modèle quadratique prédit que les valeurs optimales des facteurs de test à savoir caseine= 0.2 g/ l, amidon = 14 g / l et NaCl=3 g/l, devrait donner un maximum d'activité antibactérienne avec une zone d'inhibition de 34 mm (figure 26).

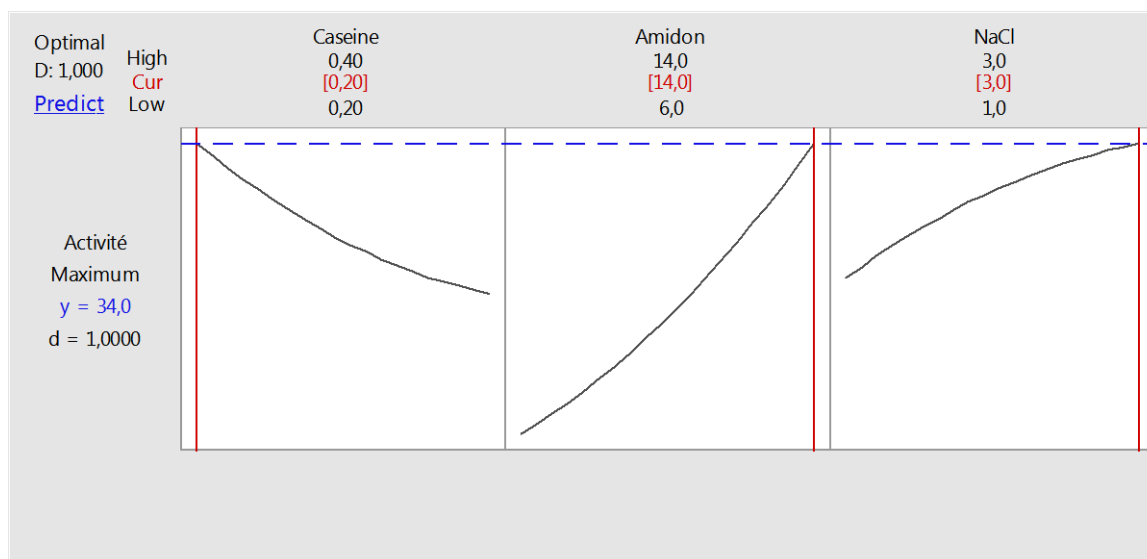


Figure 26. Réponse optimisée, Conception de surface de réponse sélectionnée en utilisant l'optimalité basée sur la distance de I4 sur M2.

Validation expérimentale de l'optimisation

Les paramètres des composants du milieu prédit à partir du RSM sont réalisés expérimentalement en triplicata pour vérifier les résultats de la modélisation. L'activité antibactérienne contre *B. subtilis* obtenue expérimentalement est de $33 \pm 1,5$ mm, ce qui correspond à la valeur prédite de 34 mm. Le milieu final optimisé contient : 0.2 g/ l, 14 g/l amidon soluble, 3 g/l NaCl.

La bonne corrélation entre les valeurs prédites et expérimentales après optimisation justifie la validité du modèle de réponse et l'existence d'un point optimal.

Souche ITA1 dans le milieu Bennett

Le résultats RSM de l'effet de trois variables indépendantes à partir du milieu Bennett(casaminoacide, extrait de levure et extrait de viande) sont présentés avec les réponses pré-dictées et observées dans le **tableau XXII**. Le tableau montre les maxima et minima des variables dans le RSM et que le total des trois points centraux est révélé aux essais n° 4, 10 et 12 et des activités antibactériennes similaires sont également observées. Toutefois, la production maximale anticipée est atteinte à l'essai n°. 06 avec 2 g / l de

casaminoacide, 1 g / l d'extrait de levure et 1 g / l d'extrait de viandes, alors que la production antibactérienne minimale ou nulle est observée dans l'essai n°. 01 avec une quantité de l'ordre de 1g / l de casaminoacide, 1 g / l d'extrait de levure et 1.4 g / l d'extrait de viande.

Tableau XXII. Conception expérimentale et résultats RSM pour la production d'antibiotiques à partir de *Streptomyces fradiae* ITA1 sur le Milieu Bennett.

RunOrder	Block	Casaminoacide (g)	E. levure (g)	E. viande (g)	Y observé (mm)	Y predicted (mm)	Y residual (mm)
1	1	1	1,0	1,4	0	3,1250	-3,1250
2	1	1	0,6	1,0	15	12,3750	2,6250
3	1	3	1,0	0,6	15	11,8750	3,1250
4	1	3	1,0	1,4	18	18,6250	-0,6250
5	1	2	1,0	1,0	16	22,6667	-6,6667
6	1	2	1,0	1,0	33	22,6667	10,3333
7	1	3	0,6	1,0	16	15,8750	0,1250
8	1	2	1,4	1,4	19	15,7500	3,2500
9	1	3	1,4	1,0	19	21,6250	-2,6250
10	1	2	1,4	0,6	16	16,5000	-0,5000
11	1	1	1,0	0,6	17	16,3750	0,6250
12	1	1	1,4	1,0	14	14,1250	-0,1250
13	1	2	1,0	1,0	19	22,6667	-3,6667
14	1	2	0,6	0,6	12	15,2500	-3,2500
15	1	2	0,6	1,4	10	9,5000	0,5000

Le **tableau XXIII** montre l'analyse de la variance ANOVA qui permet d'évaluer la signification statistique du modèle.

Le plan est valide puisque P -value (valeur P) du modèle est inférieure à celle de Lack-of-fit (**tableau XXIII**). L'analyse des paramètres linéaires indique que les variables individuelles ou indépendantes de casaminoacide et d'extrait de levure ont un effet très significatif puisque le P -value est inférieur à 0.05, c'est-à-dire qu'il influence l'activité antibactérienne, par contre l'effet individuel de l'extrait de viande n'a pas un effet significatif puisque P -value est supérieur à 0.05. Il en est de même pour l'interaction entre les paramètres, pour l'effet combiné des paramètres ou quadratique "Square" les P -value sont inférieures à 0.05 donc ils ont des effets hautement significatifs. Pour les interactions entre deux paramètres (Way Interaction), on observe une influence significative sur l'activité antibactérienne. La P -value est <0.05 pour l'interaction entre la casaminoacide et l'extrait de viande et ce dernier avec l'extrait de levure par contre cette P -value est >0.05 dans le cas de l'interaction entre la casaminoacide et l'extrait de levure donc une influence non significative. Le coefficient de détermination " R^2 ." dans ce cas est de 52,71 %, le modèle est

satisfaisant ainsi que la valeur de l'ajustement représentée par le coefficient de détermination ($AdjR^2$) qui est de 50,86 %, et qui indique la signification du modèle.

La conception à l'erreur de prédiction moyenne (Error) est supérieure à 4, donc la discrimination est adéquate (**Tableau XXIII**).

Tableau XXIII. Analyse de la variance du modèle quadratique ajusté (Régression de surface de réponse: (Activité antibactérienne d'ITA1 par rapport à la Casaminoacide; E. levure; E. viande).

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	4835,83	537,31	28,36	0,000
Linear	3	508,14	169,38	8,94	0,000
Casaminoacide	1	102,00	102,00	5,38	0,021
E. levure	1	374,61	374,61	19,78	0,000
E. viande	1	0,00	0,00	0,00	0,993
Square	3	4411,38	1470,46	77,62	0,000
Casaminoacide*Casaminoacide	1	772,96	772,96	40,80	0,000
E. levure*E. levure	1	1307,69	1307,69	69,03	0,000
E. viande*E. viande	1	1473,97	1473,97	77,81	0,000
2-Way Interaction	3	229,03	76,34	4,03	0,008
Casaminoacide*E. levure	1	50,41	50,41	2,66	0,104
Casaminoacide*E. viande	1	99,27	99,27	5,24	0,023
E. levure*E. viande	1	92,67	92,67	4,89	0,028
Error	229	4337,98	18,94		
Lack-of-Fit	2	246,51	123,26	6,84	0,001
Pure Error	227	4091,47	18,02		
Total	238	9173,82			

DF : Degrees of freedom, SS : Sum of Squares, Ms : Mean Sum of squares, adj : ajustement.

S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)
4,35237 52,71% 50,86% 51,05%

Surface de réponse et parcelles de contour

Les parcelles de contour 2D et de surface de réponse tridimensionnelle (3D) sont illustrées dans les **figures 27 (A1, B1 et C1 ; A2, B2 et C2)** décrites par le modèle de régression obtenu avec le design Box-Behnken.

Les **figure 27 A1 et A2** montrent l'effet de l'extrait de levure et de l'extrait de viande sur l'activité antibactérienne. Les données d'interaction et le tracé du contour montrent que :

- Les zones de contour représentent des réponses constantes correspondant aux activités de 12, 14, 16, 18, 20, 22 et 24.
- Le contour avec la couleur verte la plus foncée au centre indique le contour où l'activité est la plus élevée (>24).

- D'après la **figure 27 A1**, on observe que l'activité augmente lorsqu'on se déplace vers le centre donc l'activité augmente et peut être maximale lorsqu'on est dans un intervalle de concentration compris entre 0.88 g/l et 1.28 g/l d'extrait de levure et une concentration d'extrait de viande supérieure à 0.80 g/l et inférieure à 1.20 g / l.

Les figures 27 B1 et B2 illustrent l'effet de la casaminoacide et de l'extrait de viande, sur l'activité antibactérienne. Les données d'interaction et le tracé du contour montrent que :

- Les zones de contour représentent des réponses constantes qui correspondent aux activités de 15, 17.5, 20, 22.5 et 25.
- Le contour avec la couleur verte la plus foncée au centre indique le contour où l'activité est la plus élevée (>25).
- Dans la figure B1, on observe que l'activité augmente lorsqu'on se déplace vers le centre. Donc l'activité augmente et elle est maximale lorsqu'on est dans un intervalle de concentration compris entre 1.9 g/l et 2.3 g/l de casaminoacide, et une concentration d'extrait de viande supérieure à 0.80 g/l et inférieure à 1.20 g / l.

Les figures 27 C1 et C2 montrent l'effet de la casaminoacide et de l'extrait de levure, selon le **tableau XXIII** d'ANOVA, ces deux paramètres n'ont pas d'effet sur l'activité antibactérienne puisque le *P*-value est supérieure à 0.05.

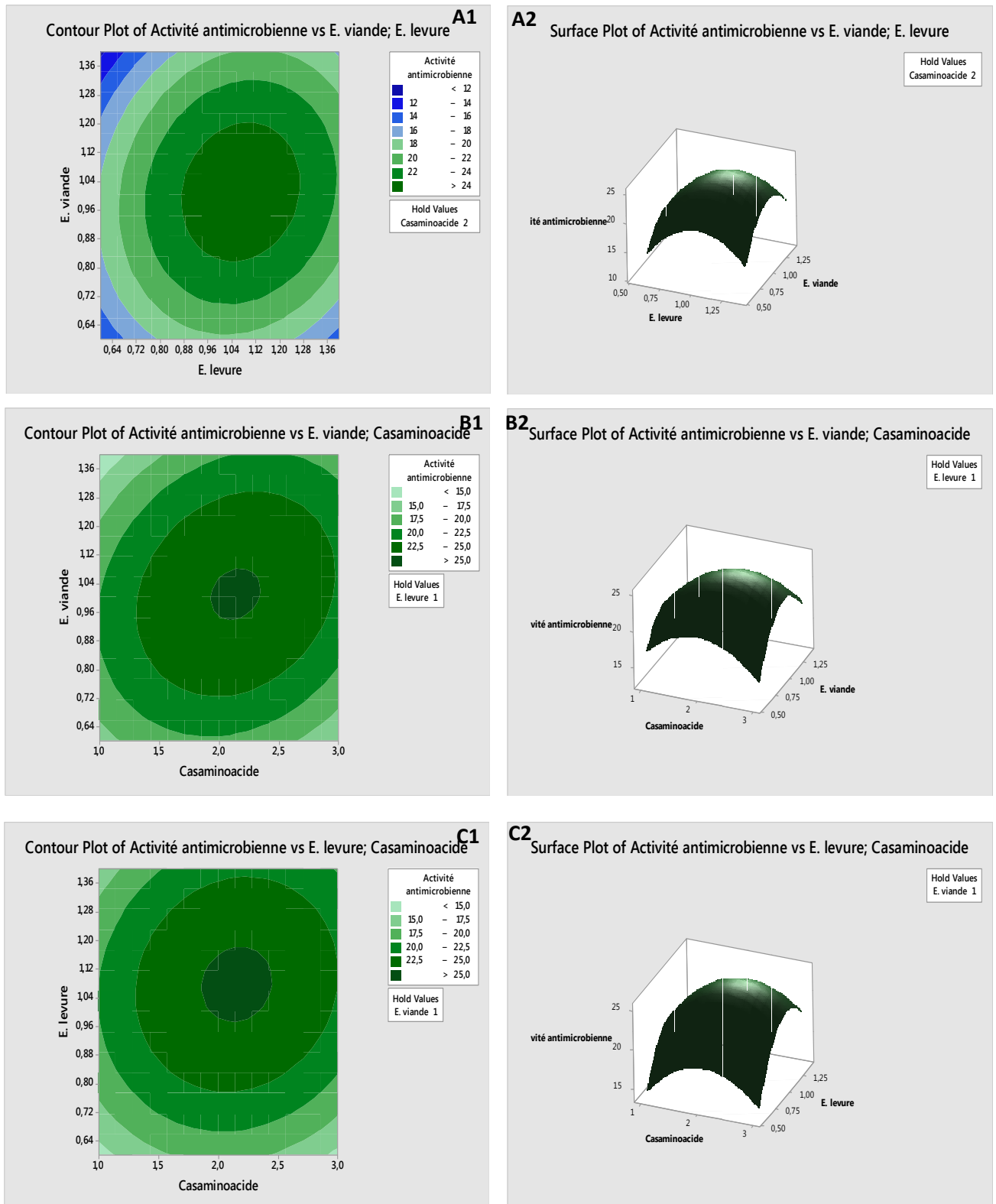


Figure 27. Surface de réponse et parcelle de contour correspondant à l'activité antibactérienne de la souche *Streptomyces fradiae*. ITA1 avec la casaminoacide, l'extrait de levure et l'extrait de viande.

(A1, B1 et C1 : parcelles de contour 2D des paramètres ; A2, B2 et C2 : surfaces de réponse 3D des paramètres).

L'optimisation numérique du modèle quadratique prédit que les valeurs optimales des facteurs de test à savoir casaminoacide= 2.1717 g/ l, E. levure = 1.0768 g / l et E. viande=1.0202 g/l, devrait donner un maximum d'activité antibactérienne avec une zone d'inhibition de 25.3583 mm (**figure 28**).

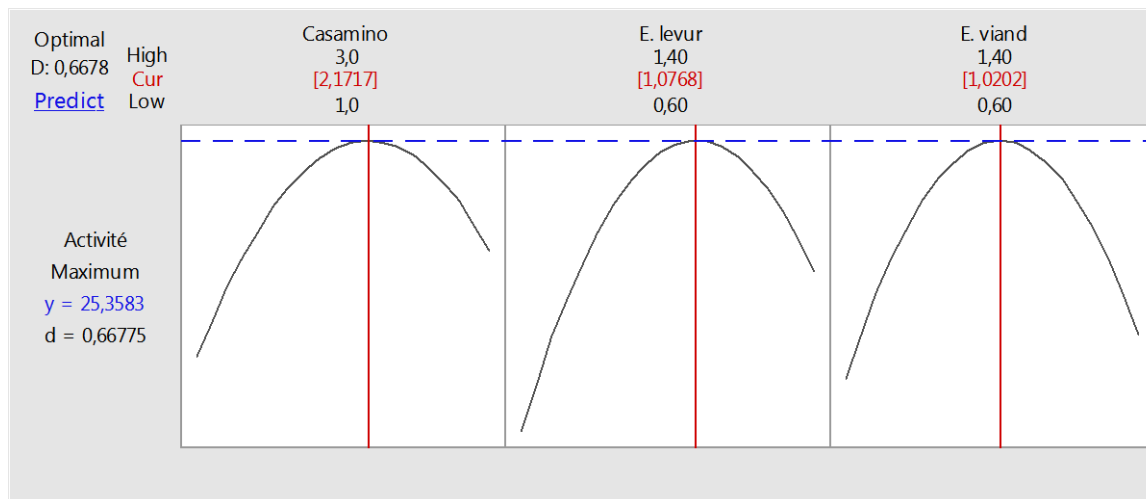


Figure 28. Réponse optimisée, Conception de surface de réponse sélectionnée en utilisant l'optimalité basée sur la distance de ITA1 sur Bennett.

Validation expérimentale de l'optimisation

Les paramètres des composants du milieu prédit à partir du RSM sont réalisés expérimentalement en triplicata pour vérifier les résultats de la modélisation. L'activité antibactérienne contre *B. subtilis* obtenue expérimentalement était de $29 \pm 1,1$ mm ce qui correspond relativement à la valeur prédite de 25.35 mm. Le milieu final optimisé contient : casaminoacide= 2.1717 g / l, E. levure = 1.0768 g / l et E. viande=1.0202 g / l. La bonne corrélation entre les valeurs prédites et expérimentales après optimisation a justifié la validité du modèle de réponse et l'existence d'un point optimal.

La capacité de production d'antibiotiques peut être affectée de manière significative par les constituants du milieu. Des études antérieures sur la production de métabolites secondaires ont été réalisées en utilisant des méthodes conventionnelles. Des méthodes statistiques telles que RSM ont été utilisées pour l'optimisation de la production des antibiotiques. Dans la présente étude, la production d'antibiotique est affectée par les sources de nutriments des milieux. Pour améliorer cette production, la concentration optimale de l'amidon doit être de 14 g / l au lieu de 10 g / l dans le milieu non optimisé. Plusieurs chercheurs ont signalé l'augmentation de la production d'antibiotiques avec des concentrations de maltose chez *Streptomyces sp.* 19 G-317 (Juntao *et al.*, 2011). On signale

que différentes sources de carbone influencent la production de métabolites secondaires. **Jubi et al. (2017)** ont trouvé qu'une concentration modérée en amidon affectait la production de métabolites de *Streptomyces nogalater* NIIST A30 isolé de Western Ghats d'un sol forestier de Kerala, India. En revanche, il n'y avait aucune production de composé antimicrobien par *Nocardiosis sp.* MAD08 lorsque le milieu a été complété par différentes sources de carbone à une concentration de 1% (p / v) (**Selvin et al., 2009**). Pour la plupart des antibiotiques issues des microorganismes, une source de carbone rapidement assimilable engendre un effet négatif sur la biosynthèse (répression catabolique ou "effet de glucose") (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1990**). Une source complexe de carbone comme les polysaccharides (amidon, dextrines) est souvent meilleure. Un exemple de réaction catabolique du métabolisme secondaire chez les actinomycètes est celui de la synthèse de l'actinomycine par *S. antibioticus* après l'addition de glucose dans les milieux (**Singh et al., 2009**). La concentration optimale de caséine doit être diminuée à 0,2 g / l au lieu de 0,3 g / l. Des résultats similaires ont montré que la source d'azote peut réduire la bonne synthèse des métabolites secondaires (**Singh et al., 2008**). Des acides aminés non appropriés utilisés comme sources d'azote peuvent inhiber une bonne synthèse des métabolites secondaires, alors que des acides aminés spécifiques peuvent améliorer la production d'antibiotiques dans certains cas. La phénylalanine, l'isoleucine, la méthionine et la tyrosine sont les acides aminés les plus appropriés pour la production de métabolites antifongiques (**Singh et al., 2008**). La concentration optimale de NaCl doit être augmentée à 3 g / l au lieu de 2 g / l. **Yang et al. (2006)** ont constaté que la production d'antibiotiques produits par *Xenorhabdus ssp.* D43 est favorisée par MgSO₄, MgCl₂, NaCl, KH₂PO₄, KNO₃ et (NH₄)₂SO₄. D43, mais la production d'antibiotiques par addition de Zn (NO₃)₂ et de CuCO₄ diminue. De même **Jubi et al. (2017)** ont trouvé qu'une concentration en (NH₄)₂SO₄ et K₂HPO₄ modérée favorise la production maximale de métabolites par NIIST A30.

Souagui et al. (2015) ont montré que des concentrations de 3,476 g/l de glucose et de 3,876 g/l d'extrait de levure avec une concentration de 41,14 g/l de NaCl améliorent significativement la production d'antifongiques par *Streptomyces sp.* SY-BS5. **Elibol (2004)** rapporte que la production d'actinorhodin produite par *Streptomyces coelicolor* A3(2) dans un milieu complexe augmente de 32 % dans le milieu optimisé par rapport à celui non optimisé. Le milieu optimisé est constitué de 339 g / l de saccharose, 1 g / l de glucose, 1,95 g / l d'extrait de levure et 2,72 g / l de peptone. Les quantités de glucose, d'extrait de levure et de peptone requises sont également réduites avec la RSM.

7. Extraction, semi-purification et essai de caractérisation des principes actifs des souches sélectionnées

La production des antibiotiques est réalisée en milieu liquide dans des erlens de 500 ml contenant 100 ml de milieu respectivement de Bennett et M2 pour les isolats ITA1 et I4. Les souches sont cultivées pendant 8 à 10 jours dans un incubateur agité à 28°C et 240 rpm.

L'extraction des antibiotiques à partir du mycélium séché est réalisée avec du méthanol. L'extrait de couleur marron foncé présente une activité contre *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition de l'ordre 16 mm.

Le filtrat de culture a fait d'abord l'objet d'un choix de solvant susceptible de réaliser une meilleure extraction de l'antibiotique ou du principe actif. Le filtrat a subi une extraction avec quatre solvants de polarités croissantes, n-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol. Les résultats des antibiographies des extraits pour les deux isolats ITA1 et I4 sont illustrés dans les **figures 29 et 31**. Les activités résiduelles des phases aqueuses obtenues après extraction sont également vérifiées.

7.1. Extraction des principes actifs et choix du solvant d'extraction de L'isolat ITA1

Les **figures 29 et 30**, montrent les activités antimicrobiennes extractibles avec les solvants organiques non miscibles avec l'eau. D'après les figures, il apparaît que la meilleure activité est retrouvée au niveau de l'extrait avec le n-butanol avec un diamètre d'inhibition de 16 mm contre *B. subtilis* ATCC 6633 et de 14 mm vis-à-vis *A. ochraceus*, l'activité est absente dans les phases aqueuses mais présente au niveau du mycélium. Sachant que les trois solvants testés ont tous permis l'extraction des principes actifs, ce qui suppose que les activités mesurées par antibiographie sont dues à un grand nombre de molécules ayant des structures de polarités différentes (polaires, polarité moyenne ou apolaires). Selon **Franco et Countinho, (1991) et Augustine et al., (2005)**, la plupart des antifongiques connus à ce jour, sont extraits par l'acétate d'éthyle. **Remya et Vijayakumar (2008)** cité par **Oskay (2011)** rapportent également que l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant d'extraction des molécules antibactériennes et antifongiques de la souche *Streptomyces* RM42. **Ahmed (2007)** cité par **Hozzein et al. (2011)**, rapporte aussi que l'activité antimicrobienne de *Streptomyces violachromogenes* est mieux extraite avec ce même solvant.

Il est à signaler aussi que de nombreux travaux dont ceux réalisés par **Boudjella et al. (2006) et Zitouni et al. (2005)** ont souligné l'efficacité du butanol, du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle dans l'extraction des antibiotiques synthétisés chez les genres

Streptosporangium, *Saccharothrix* et *Nocardiopsis*. Cependant il y'a lieu de relever que le *n*-butanol extrait aussi beaucoup d'impuretés non actives qui risquent de gêner la purification, comme il existe des actinomycètes « métaboliquement » intéressants qui sont signalés dans la littérature, pouvant synthétiser plus d'une trentaine d'antibiotiques, (Trujillo et Goodfellow, 1997).

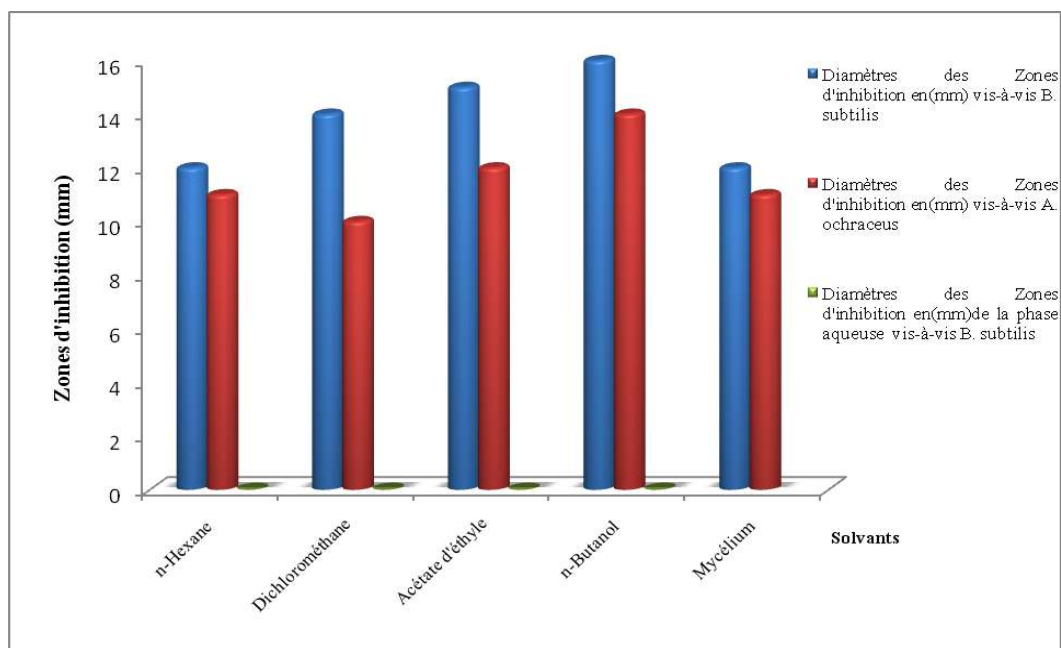


Figure 29. Activité antimicrobienne des extraits organiques du filtrat de culture de la souche ITA1 sur milieu Bennett.

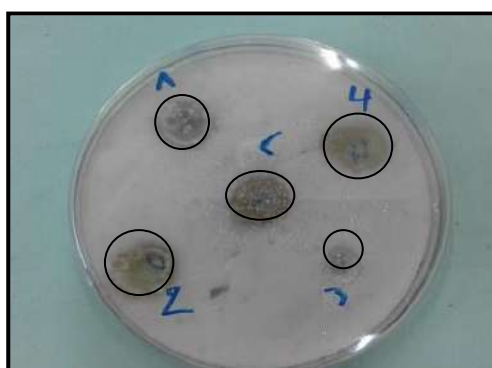


Figure 30. Antibiographie des extraits organiques du filtrat de culture de la souche ITA1 contre *A.ochraceus* ATCC3174 par la méthode des puits.

7.2. Extraction des principes actifs et choix du solvant d'extraction de L'isolat I4

D'après la **figure 31**, il apparaît que la meilleure activité est retrouvée au niveau de la phase organique de l'extrait hexanoïque avec des diamètres d'inhibition de 27 mm et de 12 mm vis-à-vis *Aspergillus niger* et *A. ochraceus* respectivement

L'activité apparaît aussi dans les deux autres extraits « dichlorométhane et acétate d'éthyle » et elle est absente dans les phases aqueuses. Par ailleurs, l'extrait méthanolique du mycélium ne montre qu'une faible activité contre *A. niger*. Cela permet de supposer que le composé actif sécrété par la souche I4 est hydrophobe et mieux extractible par les solvants apolaires et moyennement polaires. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Augustine et al. (2005)** qui ont pu extraire des activités antifongiques en utilisant de l'hexane comme solvant d'extraction dans les surnageants de culture de *Streptomyces albidoflavus*. D'autres études telles que celle de **Badji et al. (2006)**, utilisant des solvants apolaires avec le genre *Actinomadura* ont abouti à la récupération des activités antibiotiques par le benzène.

De nombreuses autres études portant sur le choix des solvants d'extractions des antibiotiques à partir des souches d'actinobactéries ont été menées parmi lesquelles nous citons les travaux de **Zitouni et al. (2005)**, **Badji et al. (2006)**, **Boudjella et al. (2007)**,

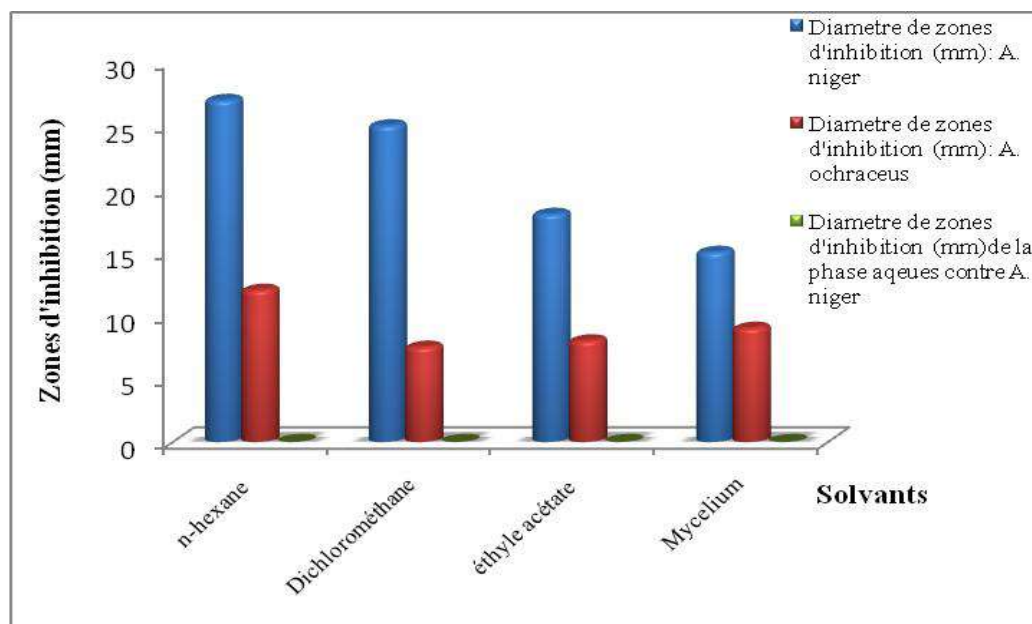


Figure 31. Activité antimicrobienne des extraits organiques du filtrat de culture de la souche I4 sur milieu M2.

L'apparition de l'activité antibactérienne dans un solvant polaire (acétate d'éthyle), de polarité moyenne (dichlorométhane) et apolaire (n-hexane) suppose qu'il s'agit soit de

plusieurs molécules de polarités différentes soluble chacune dans un solvant différent ou bien de une ou plusieurs molécules solubles dans différents solvants. Cette dernière hypothèse est plus probable puisque selon **Guernet et Hamon (1981)**, les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères polaires et apolaires entraînant une affinité pour des solvants très divers.

L'activité antifongique et antibactérienne retrouvée également dans le mycélium des souches ITA1 et I4 serait soit de même nature que celle sécrétée dans le filtrat de culture, soit de nature différente.

8. Caractérisation partielle des principes actifs par Chromatographie analytique sur couche mince

8.1. Choix du système de solvant de migration

Les molécules bioactives présentes dans les extraits butanoliques pour l'isolat ITA1 et hexanoïque pour la souche I4 sont analysées par chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice pour séparer les substances actives et détecter le meilleur système de séparation. Cinq systèmes de solvants d'élution sont testés, il s'agit de :

F. Méthanol-acétate d'éthyle (100 :15) : M.A.E.

G. N-butanol-acide acétique-eau (3 :1 :1) et (6 :1,5 :2) : B.A.E et B.A.E.M (B.A.E modifié).

H. Ethanol-triéthylamine-eau (8 :1 :1) :E.T.E.

I. Ether de pétrole-acétate d'éthyle (7 :3) :E.A.E.

J. Chloroforme-méthanol (8 :2) :C.M

La visualisation sous UV à 245 nm des chromatogrammes des extraits bruts développés sur les cinq systèmes de solvants différents révèlent une bonne séparation des bandes avec le B.A.E.M: N-butanol-acide acétique-eau-modifié (6 :1,5 :2 v/v/v) par rapport aux autres systèmes. Ce système a permis de mettre en évidence huit taches pour la souche I4 et 5 taches pour ITA1 (**figure 32**). Ce système a été retenu pour les bioautographies et les révélations chimiques.

8.2. Bioautographies

La révélation microbiologique de l'extrait butanolique avec le système B.A.E.M, à permis de mettre en évidence une seule tache active (T3) sur *B. subtilis* ATCC 6633, avec un R_f de=0,34. La bioautographie de l'extrait hexanoïque avec le système B.A.E.M permet également de mettre en évidence une seule tache active (T4) contre *Aspergillus niger* 2CA936 avec un R_f de 0,35. La bioautographie ayant révélé une seule tache active sur les

deux souches suggère que l'on est en présence soit d'un seul antibiotique soit d'un complexe d'antibiotiques à structure chimique proche et difficile à séparer par CCM. Ce phénomène été signalé par (Trujillo et Goodfellow, 1997).

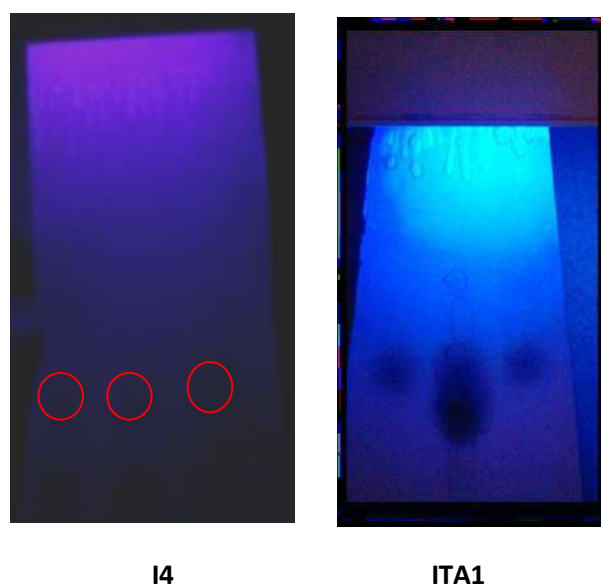


Figure 32. Chromatogramme des extraits sous lampe UV (254 nm) du système B.A.E.M. (n-Butanol-Acide acétique-Eau, 6:1.5:2, v/v/v, modifié).

8.3. Réactions chromogéniques des antibiotiques

Des tests chromogéniques sont réalisés parallèlement au bioautographies par des révélations chimiques dans les mêmes conditions. Le principe actif codé T4 de la souche I4 réagit positivement avec l'ansaldéhyde- H_2SO_4 et le Diphénylamine-aniline révélateur des glucides (**figure 33**). Il ne réagit pas avec le chlorure ferrique ($FeCl_3$), la ninhydrine, le formaldéhyde- H_2SO_4 et le réactif de Tollens. Ces résultats laisse supposer que notre produit contient dans sa structure des résidus glucidiques alors que les acides hydroxamiques, les phénols, les résidus aromatiques polycycliques, aminés, stéroïdiques et éthers sont absents (**figure 33**).

Les antibiotiques présentent des formes et structures chimiques très variées tel que les aminosides, les aromatiques, les polyènes, les nucléosides, ... etc. Ces structures différentes expliquent les activités, antibactériennes, antifongiques, antivirales et autres modes d'action des antibiotiques sécrétés par les actinobactéries dont le genre *Streptomyces* (Di Domenico, 1999 ; Boudjella *et al.*, 2007). Les résultats obtenus permettent de suggérer que notre principe actif n'est pas de nature polyénique, Ces derniers sont en effet bien extraits par le n-butanol et très peu solubles dans l'eau. Ces résultats sont intéressants car les molécules polyéniques sont indésirables dans les programmes de screening de nouvelles

molécules antifongiques en raison des problèmes liés à leur toxicité, à leur instabilité et à leur mauvaise solubilité dans l'eau (**Drouhet *et al.*, 1987 ; Gupte *et al.*, 2002**)

L'ensemble des résultats et données préliminaires nous a permis de conclure que l'antibiotique produit par la souche I4 contient des résidus glucidiques.

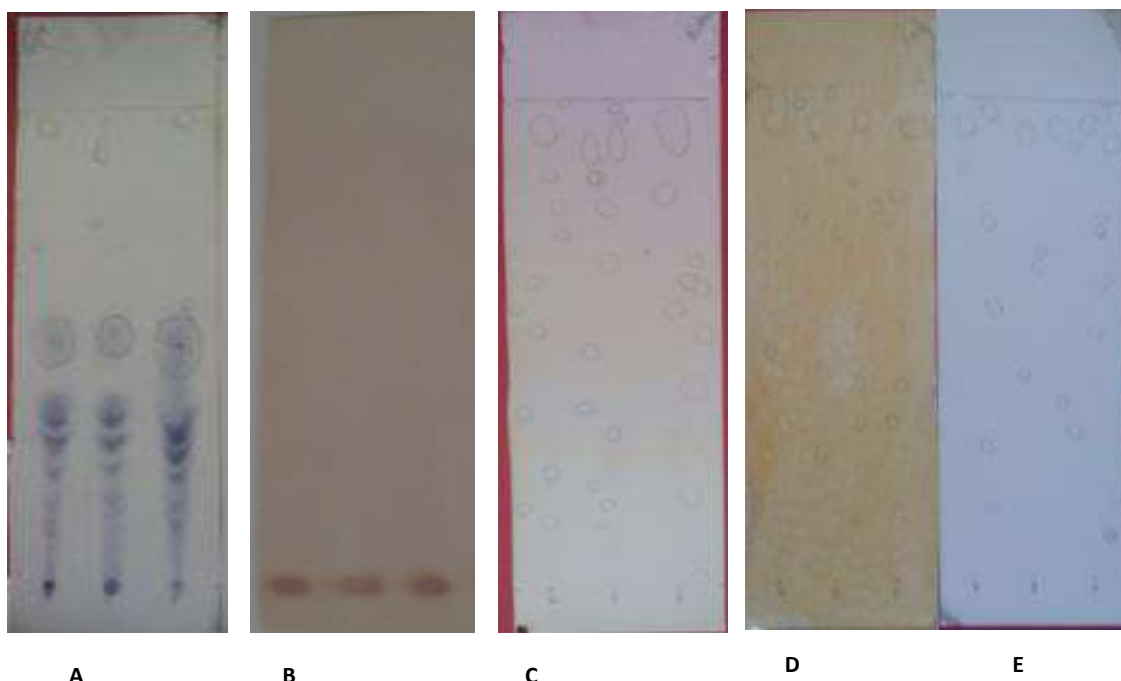


Figure 33. Chromatogramme des extraits organiques de la souche I4 en présence de différents révélateurs.

Système B.A.E.M. (n-Butanol-Acide acétique-Eau, 6:1.5:2, v/v/v, modifié)

A : Diphénylamine-aniline, B : ninhydrine, C : chlorure de fer ferrique (FeCl_3), D : réactif de Tollens, E : formaldéhyde- H_2SO_4 .

Pour la souche ITA1, le principe actif T3 réagit avec la ninhydrine et le Diphénylamine-aniline révélateur des glucides. Il ne réagit pas avec les autres révélateurs à savoir : le chlorure de fer ferrique (FeCl_3), la formaldéhyde- H_2SO_4 et le réactif de Tollens. Cela suppose que notre produit contient dans sa structure des résidus aminés, un ou plusieurs acides aminés, ainsi que des résidus glucidiques (**figure 34**). Des antibiotiques ayant de telles caractéristiques chimiques et apparaissant en tâches sombres à 254 nm), ont été identifiés par **Badji *et al.* (2006)** comme antibiotiques aromatiques contenant un noyau benzénique

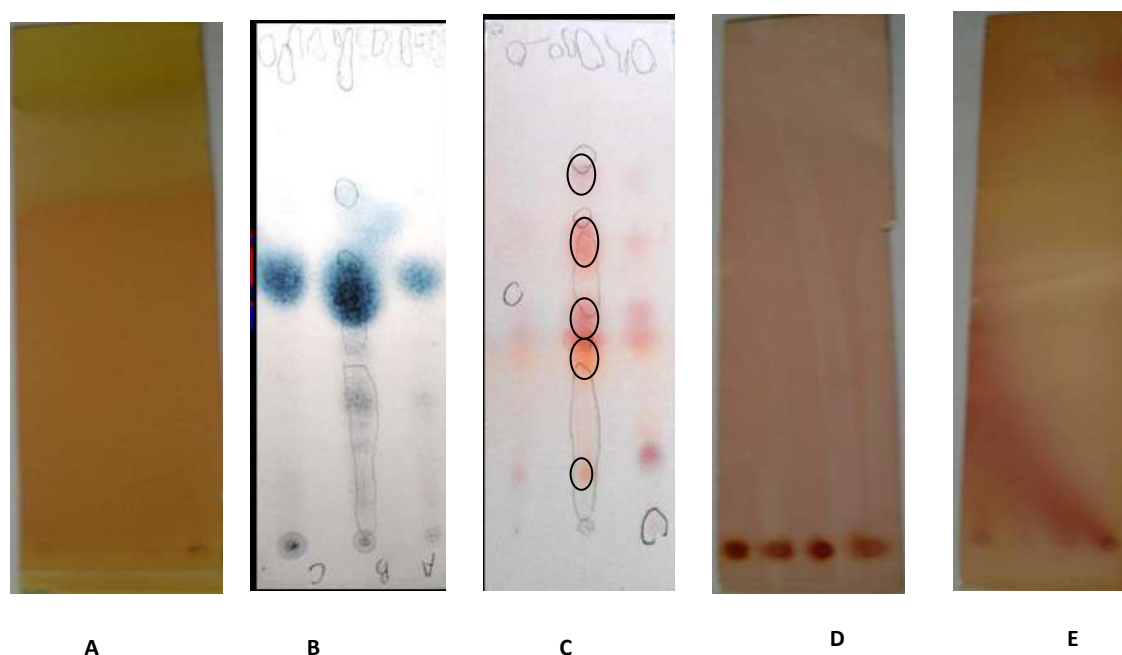


Figure 34. Chromatogramme des extraits organiques de la souche ITA1 en présence de différents révélateurs.

Système B.A.E.M. (n-Butanol-Acide acétique-Eau, 6:1.5:2, v/v/v, modifié)

A : chlorure de fer ferrique (FeCl_3), B : Diphénylamine-aniline, C : ninhydrine , D : formaldéhyde- H_2SO_4 , E : réactif de Tollens.

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

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

8.4. Spectrophotométrie UV- visible

L'étude spectrophotométrique est une technique utilisée par plusieurs auteurs (**Lindenfelser *et al.*, 1964 ; Bastide *et al.*, 1986**) pour révéler la présence de structures polyéniques parmi les molécules . Cette étude est insuffisante d'une manière générale pour identifier une structure, mais elle permet pour de faibles quantités d'antibiotiques d'avoir une première idée générale sur les produits obtenus et de détecter les composés aromatiques et les

systèmes insaturés et conjugués. Les polyènes présentent des spectres caractérisés par une série de pics entre 260-405 nm (**Hamilton-Miller, 1973 ; Bastide et al., 1986**)

La recherche d'éventuels composés polyéniques dans les extraits butanoliques et hexanoique bruts actifs de nos isolat, sont réalisée par spectrophotométrie UV-visible entre 190 et 600 nm. Les spectres UV-visible des extraits de ces souches sont présentés dans les figures 36 et 37 respectivement.

Le spectre obtenu pour l'isolat ITA1 (**Fig. 35**) de l'extrait butanolique présente des pics à 305 nm, 395 nm et 400 nm avec des absorbances respectives de 2,222, 0,943 et 0,907.

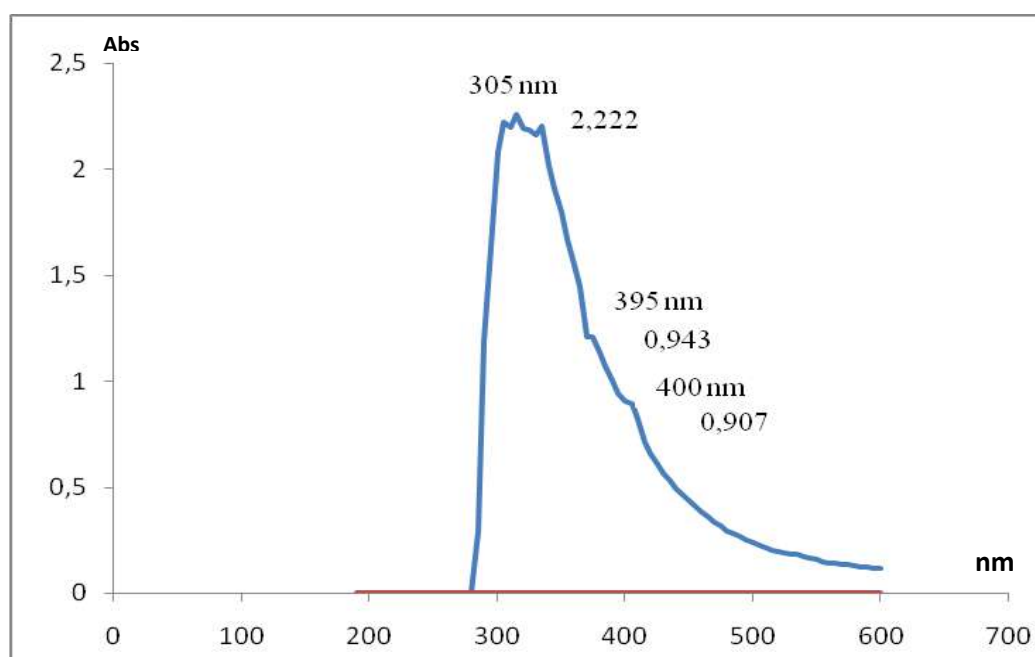


Figure 35. Spectre UV-visible d'extrait butanolique brut de l'isolat ITA1.

Le spectre UV de l'extrait hexanoique de l'isolat I4 (**Fig. 36**) présente des pics de 300 nm et 305 nm et présente avec des absorbance respectives de 0,564 et 0,563.

Les données relatives aux spectres UV visibles des deux isolats suggèrent que les substances antibiotiques produites par les souches testées n'appartiennent pas à la famille des antifongiques polyéniques lesquels sont caractérisées par la présence de trois maxima très caractéristiques entre 260 et 405 nm (**Bastide, 1986**). A titre d'exemple les Triènes : le premier pic apparaît à une longueur d'onde de 283 nm, le second à 272 nm et le troisième à 262 nm (**Boudjella, 2007**)

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

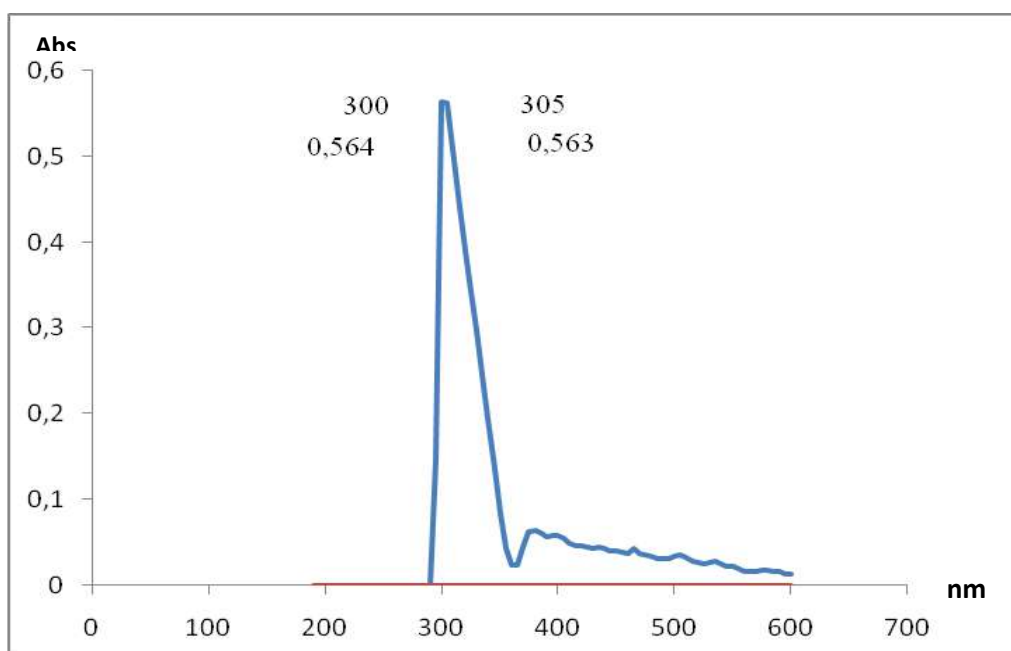


Figure 36. Spectre UV-visible d'extract hexanoique brut de l'isolat I4.

Conclusion

Parmi les nombreuses substances bioactives produites par les actinobactéries, les antibiotiques occupent la première place. Ceux-ci ont été largement étudiés notamment chez le genre *Streptomyces* qui domine dans de nombreux écosystèmes. Cependant, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les recherches sont orientées vers des genres peu fréquents et rares provenant d'environnements peu communs voir extrêmes (**Demain et Lancini, 2006**).

En Algérie, plusieurs études portant sur l'isolement des actinomycètes, la taxonomie des souches isolées et l'étude préliminaire des antibiotiques secrétés ont été réalisées. plusieurs travaux ont montré que les sols sahariens, qui représentent un écosystème particulier renferment un potentiel assez riche en actinomycètes tant du point de vue quantitatif, de la biodiversité et propriétés antimicrobiennes (**Sabaou et al., 1998**). Cependant, aucun travail à notre connaissance n'ait fait l'objet de prélèvements à partir des Chott Ain Beida et de Sebkhha de Bamendil de la région de Ouargla pour l'étude des actinobactéries

L'objet de ce travail a porté sur l'isolement de souches actinobactéries à partir des zones arides et semi-arides des sites de la région d'Ouargla. L'identification des souches sélectionnées, l'extraction et la caractérisation partielle des molécules bioactives synthétisées ont été également abordés.

La première partie de ce travail est consacrée à l'isolement et le criblage des souches d'actinobactéries productrices de substances antimicrobiennes. Une analyse physicochimique du sol nous a permis de connaître d'abord les caractéristiques et les conditions de croissance des espèces d'actinobactéries dans leur environnement. L'analyse de sol est un paramètre important à étudier, il influe directement la composante des microorganismes du sol et particulièrement celle des actinobactéries. L'isolement a été réalisé à partir trois échantillons prélevés de trois écosystèmes différents : une palmeraie, un Chott et une Sebkhha de la région de Ouargla. Chaque échantillon représente un lot moyen de 10 prélèvements. L'isolement des actinobactéries sur cinq milieux de culture à savoir M2, Bennett, GLM, ISP4 et GA a permis d'obtenir 112 isolats dont 91 à partir d'échantillons prélevés de la palmeraie de la faculté, 20 à partir de Chott Ain El Beida et un seul isolat à partir de Sabkhha de Bamendil. 81% des souches ont été isolées à partir des sols de la palmeraie ; ceci peut être expliqué par le fait que ce dernier est plus riche en matière organique que les autres sols. D'autre part, le milieu glucose asparagine (GA) s'avère être le meilleur pour l'isolement, suivi des milieux M2 et ISP4, ils ont permis ensemble l'isolement de plus de 90% des souches d'actinobactéries, comparé au milieux Bennett et GLM qui représentent seulement 10% des isolats.

Par ailleurs, il est à signaler que le nombre de souches d'actinobactéries isolées à partir de milieux additionnés d'antifongiques est nettement supérieur et les sols ayant subi un prétraitement avec le CaCO₃ ont permis l'isolement d'un nombre important d'actinobactéries par rapport aux sols non traités.

Afin d'évaluer le pouvoir antagoniste des actinomycètes isolés, un screening préliminaire de l'activité antimicrobienne contre 16 germes cibles a été effectué. Parmi les 112 isolats d'actinobactéries, 37 ont été sélectionnées pour leurs caractéristiques culturelles spécifiques notamment pour leur croissance rapide. 24 isolats (65 %) présentent une activité antibactérienne et antifongique contre au moins un germe cible parmi lesquelles 15 isolats soit 62,50% présentent une activité antibactérienne, 07 isolats soit 29,16 %, présentent une activité antifongique. Seulement deux isolats soit 8,33 % ont un large spectre sur l'ensemble des isolats actifs, il s'agit de **ITA1** et **I4** notamment vis-à-vis les espèces *B. subtilis* et *A. ochraceus*.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'identification taxonomique des souches sélectionnées **ITA1** et **I4**. Elles ont fait l'objet d'une identification polyphasique, une combinaison entre les techniques morphologiques préconisées par l'international *Streptomyces* Project, l'analyse des constituants pariétaux et l'analyse physiologique ainsi que les analyses moléculaires et phylogénétiques.

L'isolat ITA1 est constitué d'un mycelium aérien de type *RA* (*Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles), ramifié, le mycélium de substrat est très dense et se présente sous forme de filaments épais. L'isolat I4 possède un mycélium de substrat très dense et épais, il est constitué de filaments ramifiés non fragmentés chapeauté par un mycélium aérien produisant des chaînes de spores en spirales de type *S*. L'identification morphologique des deux isolats rapproche les deux souches au genre *Streptomyces*. Les résultats des constituants pariétaux révèlent la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et la glycine pour la souche I4, Ils possèdent tout les deux une paroi de type I correspondant au chimiotype IC selon la classification de **Lechevalier et Lechevalier (1970 a, b)** et **Labeda et Kroppensted (2000)**, ce qui confirme les résultats d'identification morphologiques. La souche ITA1 révèle une similarité avec *Streptomyces fradiae*.

L'optimisation de la production d'antibiotique chez la souche I4 par la méthode des surfaces de réponses « RSM » basée sur les composants du milieu révèle un milieu final optimisé avec : 0.2 g/l de caséine, 14 g/l d'amidon soluble, 3 g/l NaCl pour le milieu M2. L'activité a augmenté à 33 mm au lieu de 18 mm dans le milieu non optimisé. L'optimisation

du milieu Bennet a montré un milieu final optimisé contenant : casaminoacide= 2.1717 g / l, E. levure = 1.0768 g / l et E. viande=1.0202 g / l.

La dernière partie de ce travail concerne l'extraction et la caractérisation partielle des antibiotiques produits par les deux souches **ITA1** et **I4**. Dans une première étape, un suivi de la cinétique de croissance et de production des antibiotiques secrété est réalisé afin de détecter l'optimum de production. Les résultats révèlent que la production est maximale au 5 et 6^{ème} jour d'incubation pour la souche ITA1 et au 5^{ème} jour pour I4. On remarque un phénomène de diauxie pour les deux souches qui a été signalé par plusieurs auteurs pour des souches isolées du Sahara.

La deuxième étape concerne la production des antibiotiques par culture en milieu liquide en Erlenmeyer suivi d'une extraction liquide-liquide par des solvants organiques de polarités différentes. Des antibiographies d'extraits organiques vis-à-vis *B. subtilis* et *A. ochraceus* pour ITA1 et contre *A. niger* et *A. ochraceus* pour I4 ont été réalisées.

Les résultats indiquent que le *n*-butanol est le meilleur solvant d'extraction pour la souche ITA1 et l'hexane pour I4. Les autres solvants utilisés ont tous permis l'extraction des principes actifs ce qui suppose que les activités mesurées par antibiographie sont dues à un grand nombre de molécules ayant des structures et degrés de polarités différents. L'activité est aussi retrouvée au niveau de mycélium.

Une caractérisation partielle des antibiotiques secrétés a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM), en utilisant différents systèmes d'élution, les résultats révèlent que le système η -butanol-acide acétique-eau modifié (6 :1,5 :2) est le meilleur de point de vu séparation.

La bioautographie (révélation microbiologique) réalisée a révélé deux taches actives, avec des Rf de 0,34 et 0,35 pour les souches ITA1 et I4 respectivement.

Les réactions chromogéniques ou révélations chimiques ont révélé la présence des fractions glucidiques et protéiques au niveau des antibiotiques secrétés de la souche ITA1, alors que la souche I4 présente des fractions glucidiques seulement et montre des réactions positives avec le diphénylamine-aniline.

Les spectres UV-visible des extraits butanolique et hexanoique bruts actifs des deux isolats ITA1 et I4 a révélé des absorbances comprise entre 305 et 400 nm pour la souche ITA1, et entre 300 et 305 pour l'isolat I4 ce qui suggère que les substances antibiotiques produites par les souches testées n'appartiennent pas à la famille des antifongiques

polyèniques lesquels sont caractérisées par la présence de trois maxima très caractéristiques entre 260 et 405 nm (**Bastide, 1986**).

Les perspectives sont nombreuses et diversifiées :

- Une meilleure exploration des sites de ces stations non étudiées auparavant pour mieux connaître leur biodiversité microbienne et actinobactérienne en particulier. Ces sites peuvent en effet être un réservoir de nouvelles souches intéressantes à la fois du point de vue taxonomique et pour leur potentiel métabolique notamment en antibiotiques.
- Réalisation des tests complémentaires tel que : activités anti-inflammatoire, activités antitumorale, antivirale, inhibition d'enzymes, ...etc.
- Approfondir l'identification moléculaire des souches.
- Purification des antibiotiques par d'autres techniques chromatographiques telles que : colonne de séphadex, HPLC... et une caractérisation plus poussée avec les techniques spectroscopiques à savoir : la RMN, l'IR, la spectroscopie de masse...etc., afin de déterminer la structure chimique des antibiotiques synthétisés par les actinobactéries.
- Enfin, la réalisation de tests de génotoxicité et toxicité en général vis-à-vis des cellules animales, avant de prétendre à une application possible des antibiotiques.

Références
Bibliographiques

A

Abou-Elela G.M., Ghanem N.B., (2005). Phenotypic characterization and numerical taxonomy of some actinomycetes strains isolated from burullas lake. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31 (2): 125-144.

Ahmed Nafis, BrahimOubaha' Asma Azmani' Salah EddineSamri, Timo Niedermeyer, Lahcen Hassani, Mustapha Barakate, (2017). Novonestmycines A et B, deux dérivés d'antifongiques non polyéniques nouvellement produits par *Streptomyces* sp. Z26. *Journal de Mycologie Médicale* (27) :44-87.

Alexander, M., (1961). *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley and Sons Inc., New York, pp: 6-75.

Alferova, I. V., Terekhova, L. P. and Prauzer, K. H., (1989). Selective medium with nalidixic acid for isolating antibiotic producing actinomycetes. *Antibiot. Khimioter.*, 34: 344-348.

Alferova, I. V., Terekhova, L. P., (1989). Use of the method of enriching of soil samples with calcium carbonate for isolation of Actinomyces.

Al-Tai, A., Kim, B., Kim, S. B., Manfio, G. P. & Goodfellow, M. (1999). *Streptomyces malaysiensis* sp. nov., a new streptomycete species with rugose, ornamented spores. *Int. J. Syst. Bacteriol.*49: 1395-1402.

Ampel N.M., (1996). Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. *Emerging infect. Dis.* 2(2): 109-116.

Anansiriwattana W., Tanasupawat S., Amnuoyopol S. and Suwanborirux K., (2006). Identification and antimicrobial activities of actinomycetes from soils in Samed Island, and geldanamycin from strain PC4 – 3. *Thai J. Pharm. Sci.* 30: 49-56.

Anatoli F. et Denis S., (2006). Les médicaments antifongiques en dermatologie. *Dermatologie. Conférences Scientifiques. Volume 5. Numéro 1.*

Andriole V.T., (2000). Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. *International Journal of Antimicrobial agents* 16: 317-321.

Anibou. M; Chait. A; Ziad. A; Taourirt. M; Ouhdouch. Y; and Benherref. A., (2008). Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. *World. J. Microbiol. Biotechnol*, 24: 2019-2025.

Antoun H., et al., (1978). Actinomycetes antagonistic to fungi and not affecting *Rhizobium meliloti*. *Can J Microbiol*

Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., (2012). Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *Journal De Mycologie Médicale.*

Ara. I; and Kudo. T., (2007). *Krasilnikovia* gen. nov., a new member of the family Micromonosporaceae and description of *Krasilnikovia cinnamonea* sp. nov. *Actinomycetologica*, 21(1): 1-10.

Asanza-Teruel M.L., Gontier E., Bienaime C., Nava Saucedo J.E., Barboti J.-N., (1997). Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme Microb Technol.*, 21: 314-320.

Ascioglu S., Rex J.H., De Pauw B., (2002). Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplantants: an international consensus. *Clin. Infect. Dis.* 34: 7-14.

Asselineau J. et Zalta P., (1973). Les antibiotiques. Structure et exemples de mode d'action. Hermann (Eds.). Paris.

Athalye M., Goodfellow M., Lacey J., White R.P., (1985). Numerical classification of *Actinomyces* and *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 86-98.

Athalye. M; Lacey. J; and Goodfellow. M. (1981). Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacter.* 51 :289-297.

Aubert G., (1978). Relation entre le sol et cinq d'étéricacées dans le Sud Est de la France. *Oecol.Plant.*, 13(3) : 253-269.

Augustine S.K., Bhavsar S.P. and Kapadnis B.P., (2005). A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J. Biosci.* 30 (2): 201-211.

B Badji B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomyces* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou. 226p.

Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N., (2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*, 15: 211-219.

Balmas V., Delogu G., Sposito S., Rau D. and Migheli Q., (2005). Use of a complexation of tebuconazole with b-cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat incited by *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 480-484.

Basilio A., Gonzalez I., Vicente M.F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A., and Genilloud O., (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol.* 95: 814-823.

Bastide. A ; de Méo. M ; Andriantsoa. M; Laget. M; and Duménil. G., (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. Journal*, 2: 453-466.

Becker. B; Lechevalier. M. P. and Lechevalier. H. A., (1965). Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes. *Appl. Environ Microbiol*, 13(2): 236-243.

Becker B, Lechevalier MP., Gordon RE., Lechevalier H. A., (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of Whole cell hydrolysates. *J Appl Microbiol*, 12: 421-3.

Beck-Sagué C., Jarvis WR., (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States 1980-1990. *J Infect Dis*; 167:1247-51.

Benz F., Knusel F. Nuesch J., Treichler H., Voser W., (1974). Echinocandin B, ein nueartiges polipeptid- antibiotikum aus *Aspergillus nidulans* var. *Echinatus*. Isolierung und bausteine. *Helv. Chim. Acta*. 57: 2459-2477.

Berdy J., (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58: 1-26.

Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K. L., (1987). CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2004). Vol. 4. Garrity G.M., Bell J.A and Lilburn T.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 401p.

Betina V., (1973). Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J Chromatogr*; 78: 41-51.

Bhattacharyya. B.K; Pal. S.C; Sen. S.K. (1998). Antibiotic production by *Streptomyces Hygroscopicus* D1.5: Cultural effect. *Rev. Microbiol*, 29 (3).

Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P., and Marquier P., (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle. *Hyg. Rev*, N°3.

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H. P., and Sabaou N., (2013). *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 549-553.

Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P., (2005). Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale*, 15: 39-44.

Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N., (2007). Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *J Appl Microbiol* ;103:1364-5072.

Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N., (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 161: 288-298.

Boudjella H., Zitouni A., Coppel C., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A., (2010). Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *Journal of Antibiotics*, 63: 709-711.

Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A., (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebka de Ain Mlila. *Sciences & Technologie C*; 23: 5-10.

Brautaset T., Sekurova O.N., Sletta H., Ellingsen T.E., Strom A.R., Valla S. and Zotchev S.B., (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry and Biology*. 7 : 395-403.

Brent K.J., (1984). Fungal diseases of plants and the effectiveness of present methods of control. *In: Mode of action of antifungal agents*. (Trinci, A.P.J. and Ryley, J.F., Eds). Cambridge University Press, pp. 1-15.

Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J. and Vobi G., (1989). Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. *In: Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent, J.P. and Sanglier, J.J. (Eds). Paris, Masson, pp. 33- 70.

Buchanan R. E., (1917). Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. 11. The primary subdivisions of the schizomycetes. *J. Bacteriol.* 2 : 155-164.

Bycroft B.W., (1988). *Dictionnaire of antibiotics and related substances*. London: Chapman and Hall, 944 p.

C Carle S., (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*;36: 25-41.

Cavala M., Eberlin T., (1994). Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron*. 4: 13-7.

Chaussod R., 1992.- La qualité biologique des sols : évaluation et implication. *Etude et gestion des sols*. N° 3. Vol 4, pp. 216-275.

Cherai N. and Gacemikirane D., (2012). Isolement des souches d'actinomycètes productrices de nouvelles molécules antifongiques. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* 6 (1): 18-34.

Chun J., Blackall L. L., Kang S., Hah Y. C., Goodfellow M., (1997). A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. Nov., *Int. j. Syst. Bact.* 47: 127-131.

Colombié. V. (2005). - Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.

Conn. V.M., (2005). Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 297.

Coombs J.T., Franco, (2003). Isolation and identification of actinobactéria from surface sterilised weat roots. *Ame. Soc. Microbiol.*, 69 (9): 5603-5608.

Couturaud F., (2004). Aspergillus et poumon. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*; 44 : 83-8.

Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M., Ousley M.A., (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol* 59: 3899-905.

Cross T., (1982). Actinomycetes a continuing source of new metabolites. *Development in industrial Microbiology*, 23: 1-8.

Cross T., (1981). Aquatic actinomycetes : a critical survey of the occurrence growth and role of actinomycetes in aquatic habitats *J. Appl. Bacteriol.* 50, 397-410.

Dairi T., (2005). Studies on Biosynthetic Genes and Enzymes of Isoprenoids Produced by Actinomycetes. *Journal of Antibiotics*, 58 (4): 227-243.

Dastager S.G., Li W. J., Agasar D., Sulochana M.B., Tang S.K., Tian X. P. and Zhi X.Y (2007). *Streptomyces gulbargensis* sp. nov., isolated from soil in Karnataka, India. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91: 99-104.

Davies F.L. et Williams S.T., (1970). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. 1/ The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil. Biol. Biochem.* 2: 227-238.

Deacon J.W., (1984). Fungi as saprophytes; microbial interactions. In: *Introduction to Modern Mycology. Basic Microbiology Vol. 7.* Ed. Wilkinson, J.F., 167-182pp. Blackwell Scientific Publications, London.

Demain A.L; and Lancini G., (2006). Bacterial Pharmaceutical Products *in* Prokaryotes, 1: 812-833.

Denning D. W., (2002). Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 889- 891.

Deshpande B.S., Ambedkar S.S. and Shewale G.G., (1988). Biologically active secondary metabolite from *Streptomyces*. *Enzyme Microb. Technol.*, 10: 455-473.

Devereux R., He S.H., Doyle C.L., Orkland S., Stahl D.A., Le Gall J., and Whitman W.B., (1990). Diversity and origin of *Desulfobivrio specis*: phylogenic definition of a family. *J. Bacteriol.*, 3609-3619.

Di Domenico B., (1999). Novel antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology* 2, 509-15.

Dommergues Y. et Mangelot F., (1970). Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris.

Driche E., (2010). Recherche des Streptomyces actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS Kouba, Alger.

Drouhet E., (1978). Antifungal agents. *Antibiot Chemother*, 25: 253-88.

Drouhet E., Dupont B., (1987). Evolution of antifungal agents: past, present and future. *Reviews of Infectious Diseases*, 9: 4-16.

Duchauffour P., (2001). Introduction à la science du sol. Sol, végétation et environnement. 6^{ème} Ed., Dunod, Paris. 331p.

Dupain R., LANCHON R., et SAINT-ARROMAN J. C., 1955.- Granulats, sols, ciments et bétons, caractérisation des matériaux de génie civil par les essais de laboratoire. Edition CASTEILLA, Paris, 335 p.

Dupont B., (2007). Utilisation des antifongiques topiques. *Thérapie*, 61 : 251-254.

Duraipandiyan V., Sasi A.H., Islam V.I.H., Valanarasu M., Ignacimuthu S., (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *J. Mycol. Med.*, 20:15-20.

Dynia. Z.M. ; Sztaricskai. F.J., (1986). Ultraviolet and light spectrometry. In: A modern analysis of antibiotics. Aszolas. A. Eds, Marcel. Dekker. inc New York, PP. 19-96.

E Eckwall E.C., et Schottel J.L., (1997). Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain Pon SSII. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 19:220-225.

Eder C., Kurz M. and Wink J., (2002). Use of thiolutin dioxide and its derivatives for the treatment of CNS disorders and a process for the preparation thereof. *Eur. Pat. Appl.*, p.1 l.

El-nakeeb M.A., Lechevalier HA., (1963). Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol.* 75-7.

El-Shatoury. S; Mitchell. J; Bahgat. M; and Dewedar. A., (2004). Biodiversity of Actinomycetes in a Constructed Wetland for Industrial Effluent Treatment. *Actinomycetologica*, 18 (1): 1-7.

El-Tarabily K. A., Nassar A. H., Hardy G. E. S. J. and Sivasithamparam K., (2009). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum* a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J. Appl. Microbiol.*, 106: 13-26.

Ensign J., C., (1978). Formation, proprieties and germination of actinomycètes spores. *Annu. Rev. Microbiol.*, 32: 185-219.

Eunice J.A and Prosser J.I., (1983). Mycelial growth and branching of *streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *J. gen. Microbial.*, 129: 2029-2036.

Euzéby J., (2010). List of prokaryotic names with standing in nomenclature.

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

F Farid M.A., EL-Enshasy H.A., EL-Diwany A.I. and EL-Sayed A.E., (2000). Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *Journal of Basic Microbiology*, 40: 157- 166.

Fiedler H.P., Schuz T., Decker H., (1993). An overview of nikkomycins; history, biochemistry, and applications. In "cutaneous antifungal agents" (Rippon J.W., Fromfling R.A., eds) Marcel Dekker, New York, pp 325-352.

Finance C., Ouhdouche Y., Jaques A., Bonaly R., (1985). Nouvelles substances à action antifongique produites par des souches d'actinomycétales isolées à partir des milieux naturels. *Ana. Biol. Clin (Paris)*. 43: 652.

Franco. M.M.C; and Countinho. L.E.L., (1991). Detection of novel secondary metabolites; *Crit. Rev. Biotechnol.* 11: 193-276.

G Ganesh Kumar C., Mongolla P., Joseph J., Nageswar Y.V.D., Kamal A., (2010). Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. *Journal de mycologie medical* (20), 283-289. DOI: 10.1016/j.mycmed.2010.08.002.

Gellen-Dautremer J., Lanternier F., Dannaoui E. and Lortholary O., (2010). Associations antifongiques dans les infections fongiques invasives. *La Revue de médecine interne*. 31: 72-81.

Genties J.C., (1958). Experimental ringworm in guinea pigs : oral traitement with griseofulvin. *Nature*, 182: 476-477.

Gesheva V., Ivanova V. and Gesheva R., (2005). Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.* 160: 243-248.

Gold W., Stout H.A., Pagano J.S., Donovan R., (1956). Amphotericin A and B: antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Annu.* 56: 579-586.

Goodfellow M., Whitman W.B., Kämpfer P., Busse, H.J. Ludwig, W., Trujillo M.E. and Suzuki K., (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, seconde edition, Vol. 5, part 2, Goodfellow *et al.* (Eds.), Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2083 p.

Goodfellow M., (1989). Genus *Rhodococcus* Zopt. In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Williams S.T., Sharpe M.E and Holt J.G (Eds). The Williams and Wilkins Co., 4, 2363-2371.

Goodfellow M., (1985). Actinomycetes systematic: present and future prospects. Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology. Szabo G., Biro S. and Goodfellow M (Eds.), 487-496.

Goodfellow M. and Williams S. T., (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37:189-216.

Goodfellow M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *Journal of General Microbiology*, 6: 33-90.

Gorajana Adinarayana, Ellaiah Poluri and Axel Zeeck. (2010). Cytotoxic compounds from a marine actinomycete, *Streptomyces albovinaceus* var. *baredar* AUBN10/2. *Afr. J. Biotechnol.* 9: (42) 7197-7202.

Gordon R.E., Barnett D.A., Handarhan J.E., Pang C.H.-N., (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 54-63.

Goshi K, Uchida T, Lezhava A, Yamasaki M, Hiratsu K, Shinkawa H, Kinashi H., (2002). Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 184:3411-3415. doi: 10.1128/JB.184.12.3411-3415.2002.

Gottlieb D., (1973). General consideration and implication of the actinomycetal. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Edited by G Sykes and F. A. Skinner. Academic Press, London, New York.

Goudjal Y., Toumatia O., Yekkour A., Sabaou N., Mathieu F. and Zitouni A. (2014). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol. Res.*, 169 : 59-65.

Grigorova R., Norris J. R., (1990). *Methods in microbiology*. VOL 22, Academic Press, London.

Groll A.H., Sein T., Petraitis V., Petraitiene R., Callender D., Gonzalez C.E., Giri N., Bacher J., Piscitelli S. and Walsh T.J., (1998). Compartmental pharmacokinetics and tissue drug distribution of the pradimicin derivative BMS 181184 in Rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 2700-2705.

Guernet M., Hamon M., (1981). *Abrégé de chimie analytique*. 1. Chimie des solutions. 2 Ed. rév. et augm., Masson, Paris.

Gupte M., Kulkarni P., Ganguli BN., (2002). Antifungal antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 46-57.

H Hacene H., Sabaou N., Bounaga N., Lefevre G., (1994). Screenig for non polyenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. *Microbios*. 79:81-5.

Hagedorn C., (1976). Influence of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Applied. Environmental Microbiology*, 32: 368-375.

Hall T.A., (1999). Bio Edit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acid. Symp. Ser.* 4195-98.

Hamilton-Miller. J.M., (1973). Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Bacteriol Rev*, 37(3), 166–196.

Hamoir J, Goret M., Mignon B., Gustin P., (2001). Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Ann. Méd. Vét.*, 145 : 226-232.

Hayakawa M. (2008). Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. *Actinomycetologica*, 22 (1): 12-19.

Hayakawa. H, Yoshida. Y, and Imura Y. (2004). Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol*, 96: 973-981.

Hazen E.L., Brown R., (1950). Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, (NY)., 76: 93-97.

Hermans. L ; Gossele. F ; et Biot. A. (1989). Fermentations industrielles. *In: Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent. J.P ; et sanglier. J.J. (Eds.). Masson, Paris, pp. 342-380.

Hilali L., Khattabi A., Nessarlah N., Malki A. et Finance C., (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycétales productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel Marocain. *Rev. Biol. Biotech.* 2: 49-53.

Hildik-smith G., Blank H., Sarkany I., (1964). *Fungus diseases and their treatment*. Little, Brown, Co., Boston U.S.A., 370-377.

Hirsch C.F., and Christensen L., (1983). -Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol*, 46 (4): 925-929.

Holmalahti. J; Raatikainer. O; Wright. A; Laatsch. H; Spohr. A; Lyngberg. OKJ. (1998). Production of dihydroabikoviromycin by *Streptomyces anualatus*, production parameters and chemical characterization of genotoxicity. *J. Appl. Microbiol*, 85: 61-8.

Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T., (1994). *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P.S., Teniola D and Addo P., (2002). Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/ or zearalenone. *PCT Int. Appl.*, p. 19.

Hozzein W.N., Rabie R., Ali M.I.A., (2011). Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(12): 2295-2301.

Hozzein. W.N; A. Ali. M.I; Rabie. W. (2008). A new preferential medium for enumeration and isolation of desert actinomycetes. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 1547-1552.

Hwang G., Byung K., Lim S., WON, (2001). Isolation and in vitro and in vivo antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Envir. Microbiol.* 67: 3739-3745.

J Jacque A., (1985). Contribution à l'étude des antifongiques : recherché de nouvelles substances produites par les actinomycétales. Thèse de doctorat d'état en pharmacie Nancy I.

Joffin J .N. and Leyrol G., (2006). Microbiologie technique. Dictionnaire des techniques 4ème Edition. Tome 1. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, France. ISBN 2 86617 515 8.

Jubi J. Reshma U. R., Dileep K., Bhaskaran N., Saraswathy A., 2017. Enhanced antibacterial metabolite production through the application of statistical methodologies by a *Streptomyces nogalater* NIIST A30 isolated from Western Ghats forest soil.

Juntao F., Wugang Z., Lirong H. and Xing Z. (2011). Statistical optimization of medium components to improve the antibiotic activity of *Streptomyces sp.* 19 G-317. *Afr. J. Agric. Res.* 6(19): 4424 4431.

K Kecha M. (1996). Isolement et sélection de deux souches de *Streptomyces* productrices d'antifongiques non polyéniques. Taxonomie; extraction, purification et caractérisation partielle des antibiotiques synthétisés. Thèse de Magister. Université de Tizi Ouzou. Pp 127.

Kelly K.L. and Judd D.B., (1976). Color. Universal Language and Dictionary of Names (National Bureau of Standards Special Publication 440). Washington, DC: US Department of Commerce.

Kerridge D., Whelan W.L., (1984). The polyene macrolide antibiotics and 5- fluorocytosine: molecular actions and interactions. In "Mode of action of antifungal agents" Cambridge University Press. Cambridge. 343-376.

Khachatourians G.G., (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association (CMAJ)*, 159 (9): 1129-1136.

Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F. and Lumyong S., (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsia. J. BioSci.*, 4: 23-32.

Kieser T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics: John Innes Foundation, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK.

Killian CH., Feher D., (1939). Microbiology of desert soils. *Encyclopedie Biologique*, pp: 21-127.

Kim M., Oh H.S., Park S.C. and Chun J., (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64: 346-351.

Kim Y. S. and Kawai A. (1998). Studies on the antiviral mechanisms of protein kinase inhibitors K-252a and KT5926 against the replication of vesicular stomatitis virus. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 21(5): 498-505.

Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioia S., Boughachiche F., Zerizer H., Hamdiken H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P., (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal de Mycologie. Médicale*, 15: 45-51.

Koltin Y. and Hitchcock C.A., (1997). The search for new triazole antifungal agents. *Current Opinion In Chemical Biology*, 1: 176-182.

Kumar S., Kannabiran K., (2010). Antifungal activity of *Streptomyces* VITSVK5 spp. against drug resistant *Aspergillus* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients. *J. Mycol. Med.*, 20: 101-107.

L Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M., (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 331-336.

Lacey J. and Cross T., (1989). Genus *Thermoactinomyces* Tsiklinsky 1989, 501 L. In : “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” Williams S.T., Sharpe M.E & Holt J.G (Eds)., Baltimore: Williams & Wilkins., 4: 2574-2585.

Lacey J., (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol., Symp. Ser.*, 2: 231-251.

Lacey J., (1997). Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*, 4: 113-121.

Lacroix C., Dubach M., Feuilhade M., (2003). Les échinocandines : une nouvelle classe d’antifongiques. *Médecine et maladies infectieuses* 33 : 183-191.

- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F., (2002a). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *Journal of Antibiotics*, 55: 696-701.
- Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E. and Tillequin F., (2002b). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *Journal of Antibiotics*, 55: 702-707.
- Larpent J. P. et Larpent-Gourgand M. (1990). *Mémento Technique de Microbiologie*. TEC & Doc-Lavoisier. France. 66.
- Larpent J.P., Sanglier. J.J. (1989). *Biotechnologies des antibiotiques*. Masson. Paris, p. 481.
- Lavigne J-P., (2007). *Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance*. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- Lechevalier M.P., (1981). Ecological associations involving actinomycetes. *In : Actinomycetes. Shaal and Pulverer (Eds.). Zbl. Bakt. suppl.*, 11: 159-166.
- Lechevalier M.P., De Bievre C., Lechevalier H.A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5: 249-260. Lechevalier M.P.,
- Lechevalier M.P., Lechevalier H.A., (1970a). Composition of whole cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes *in: The Actinomycetales*. Prauser. H; Fisher Verlag. G., Jena, 311-316.
- Lechevalier H.A., (1970b). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20: 435-443.
- Lee et Hwang, (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.*, 48 (5): 407-417.
- Leminor L., Veron M., (1989). *Bacteriologie médicale*. 2 ème édition. pp 335-349.
- Lepoivre P., 2003. *Phytopathologie*. De Boeck et Lacier, Bruxelles.
- Li L.V., Terekhova L.P. and Gapochka M.G., (2002). Isolation of actinomycetes from soil using extremely high frequency radiation. *Microbiologia*, 71: 119-122.
- Lindenfelser. L.A; Shotwell. O.L; Bachler. M.J; Shannon. G.M; and Pridham. T.G., (1964). Antibiotics against plant disease. VIII. Screening for non polyenic antifungal antibiotics produced by Streptomycetes. *Appl. Microbiol*, 12 (6), 508-512.
- Locci R., (1994). Actinomycetes as plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 179-200.
- Long P. F., Wildman H. G., (1993). Strategy for the use of pretreatment in the isolation of non streptomycetes actinomycetes from soil. *Actinomycetes*, 4: 59-64.

Loria A., (1986). The national institute of health quality control program. III. Flloq-up studies (phase 3). *Rev. Invest. Clin.*, 38: 435-440.

Lortholary O., Michel T., Bertrand D., (1999). Antifongiques. Encyclopidie Médicaux Chirurgicale (Elsevier, Paris), Maladie infectieuse, 8004-M-10.21p.

Lurie L.M., Verkhotseva T.P., and Levitov M.M., (1975). Penicillin biosynthesis and two phase pattern of *Penicillium chrysogenum* development. *Antibiotiki*, 20 : 291-295.

M

Marchal N. and Bourdon J.L., (1973). Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds). Paris. 179p.

Mariat F., Sebald M., (1990). « Les actinomycetes » Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-science. Flammarion, France.

Martin J.F., (1979). Polyene macrolide antibiotics. *In: Economic Microbiology*. Rose A.F. (Ed.). Academic Press, London, pp. 355-387.

Matan N and Matan N., (2008). Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62: 75-78.

Maur N., (1990). Vade-mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques antiinfectieux. 5^{ème} Ed : *Maloine*, Paris, 245-276.

McCarthy A.J. and Williams S.T., (1990). Methods for Studying the Ecology of *Actinomycetes* Methods In Microbiology. (Eds). Grigorova R. and Norris J.R, Academic Press Limited, London, 22: 533-363.

Mechlinski W., (1978). The polyene antifungal antibiotics. *In: Handbook of microbiology*. Vol. 3. Laskin A.I. and Lechevalier H.A. (Eds). CRC Press. pp. 93-107.

Medoff G., Kobayashig A., (1980). The polyènes. In ''Antifunfal Chemotherapy''. (Speller D.C.E. ed). John Wiley & Sons. Ltd. Chichester. U.K. 3-33.

Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Spröer C. and Klenk H.P., (2013). When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Arch. Microbiol.*, 195: 413-418.

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P., Sabaou N., (2013). *Actinopolyspora righensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek*. Doi: 10.1007/s10482-012-9859-z

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P. and Sabaou N., (2012). *Actinopolyspora algeriensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil. *Extremophiles*, 16: 771-776.

Merck E., (1975). Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt. 149 p.

Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A., (2010). Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *Journal of Natural Products*, 73, 1164–1166.

Messis A., 2014. Isolement et criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non polyéniques. Thèse de doctorats, Université de Bejaia. 182p.

Messis A., Bettache., Brahami A., Kecha M. et Benallaoua S., (2014). Optimization of antifungal production from a novel strain *Streptomyces* sp. TKJ2 using response surface methodology. *Med. Chem. Res.* 23 : 310-316.

Mieth H., (1993). In vitro and in vivo activities of terbinafine in cutaneous antifungal agnts. (ripon J.W., Fromtling R.A., eds), Marcel Dekker, New York. 137-149.

Misato T., (1982). Recent status and future aspects of agricultural antibiotics, p. 241-246. *In: Miyamoto J. and Kearney P.C. (eds.). Pesticide chemistry: Human welfare, the environment and natural products.* Pergamon Press, New York.

Mohamed Saleh Abdelfattah, Mohammed Ismail Youssef, Elmallah Usama, Wahid Hawas, Lamia Taha Abou El-Kassema, Mennat Allah GamalEid, (2016). Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (8) : 651-657.

Muiru W.M., Mutitu E.W., Mukunva D.M., (2008). Identification of selected actinomycetes isolated and characterisation of their metabolites. *J. Biol. Sci.*, 8(6): 1021-1026.

Murat Elibol, 2004. Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology. *Process Biochemistry* (39) : 1057–1062.

Murakata C., Matsuda Y., (1998). Development of the bioprobe K-252a for treatment of neurodegenerative diseases. *Bio. Industry.*, 15 (7): 43-49.

N Nouasri A., (1996). Les genres *Microellobosporia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (Actinomycetales) dans les sols sahariens : Taxonomie numérique, production, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. Thèse de Magister. Pp 130.

Niladevi K.N., Rajeev K., Sukumaran, Nicemol J., Anisha G.S. and Prema P., (2009). Optimization of laccase production from a novel strain - *Streptomyces psammoticus* using Response Surface Methodology. *Microbiol. Res.* 164: 105-113.

O Odds F. C., (1995). Les antifongiques, leur passé, leur présent et leur avenir. Bull. Soc. Fr. Microbiol., 10 (4): 285-293.

Oestergaard P.R., and Sjoeholm C., (2001). Use of acid-stable proteases in animal feed. PCT In Appl., p. 49.

Ohmori K., Ishii H., Manabe H., Satoh H., Tamura T. and Kase H., (1988). Antiinflammatory and antiallergic effects of a novel metabolite of *Nocardiosis* sp. as a potent protein kinase C inhibitor from microbial origin. *Arzneimittelforschung*, 38: 809-814.

Okami Y., et Hotta K., 1988-"Search and discovery of new antibiotics" in «Actinomycetes in biotechnology». Academic Press.

Okami Y., Hotta K., (1988). Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M., Williams S.T., Mordarski M. *Biotechnology*. Ed. Actinomycetes, Academic Press, London, 33-67.

Oroshnik W. and Mebane A.D., (1963). The polyene antifungal antibiotics. In: "Progress in the chemistry of organic natural products" Zechmeister L. (Eds), Springer Verlag, Berlin, 21, 17-79.

Oskay M., (2011). Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp., KGG32. *Int. J. Agric. Biol.* 13:317-324.

Oskay M., (2009). Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *Academic journal*. 8 (13): 3007-3017.

Oskay M., A. Tamer. and Azeri C., (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol.*, 3(9): 441-446.

Ouhdouch Y., Barakate M., Finanse C., (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.*, 37: 69-74.

P Papp M., Kase H. and Gigler G., (1992). Antiinflammatory effect of a protein kinase C inhibitor (K-252a) on the development of the dextran-induced paw edema in the rat (preliminary results). *Acta Physiol Hung.*, 80: 423-425.

Patel J.J. et M. E. Brown M.E., (1969). Interactions of Azofosacfer with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant Soil*; 31: 273-281.

Pathalam Ganesan' Appadurai Daniel Reegan' Rajendran, Antony David' Munusamy Rajiv Gandhi' Michael Gabriel Paulraj' Naif Abdullah Al-Dhabi' Savarimuthu Ignacimuthu', (2017). Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. *Alexandria Journal of Medicine*, (53) : 101-110.

Peltola J.S.P., Anderson M.A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R.M., Busse H.J., Salkinoja-Salonen M.S. and Rainey F.A., (2001). Isolation of toxigenic *Nocardiosis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardiosis* species, *N. exhalans* sp.nov. and *N. umidischholae* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.*, 67: 4293-4304.

Pfaller M.A., (2002). Focus on fungal infections. 12, Phoenix Arizona March.

Pfefferle C., Theobald U., Gürtler H., Fiedler HP., (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Bio-technol*; 80: 135-42.

Piret J.M. and Demain A.L., (1988). Actinomycetes in biotechnology: an overview in: Goodfellow, M., Mordarski, M and Williams S.T. (Edn.) Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London, pp 461 -482.

Pirt S.J; and Righelato R.C., (1967). Effect of Growth Rate on the Synthesis of Penicillin by *Penicillium chrysogenum* in Batch and Chemostat Cultures. *Appl. Environ. Microbiol*, 15 (6): 1284-1290.

Pizzul L., (2006). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). pp 39.

Pochon J., Tardieux P., (1962). Technique d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la Tourtourelle, Saint-Mandé (22).

Prescott, Willey J., Sherwood L. M., Woolverton C., (2013). Microbiologie. 4^{ème} édition, de boeck, Paris, 1070p.

Q Qin S., Zhao G. Z., Li J., Zhu W. Y., Xu L. H. and Li W. J., (2009). *Actinomadura flavalba* sp. nov., an endophytic actinomycetes isolated from leaves of *Maytenus austroyunnanensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59: 2453-2457.

R Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kropensstedt R.M. and Stackebrandt (1996). The genus *Nocardiosis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycetes lineage proposal of *Nocardiosaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 1088-1092.

Rapilly F., (1968). Techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphyties*, 19, numéro hors série.

Raty K., Kantola J., Hautala A., Hakala J., Ylihonko K. and Mantsala P., (2002). Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* a clacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene.*, 293, 115-122.

- Saadoun I., Gharaibeh R., (2003). The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *J. Arid Environ.* 53: 365 - 371.
- Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H., Bounaga N., (1992). Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can J Microbiol*; 38:1066–73.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*; 9:147-53.
- Sabaou N., (1988). Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger. 192 p.
- Sahin N., Ugur A., (2003). Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates. *Turk J Biol.* 27: 79-84.
- Sallam L.A.S., EI-Abyad, M.S., EI-Refai, A-M.H., EI-Menofi, H.A., Adham N.Z. (1995). Bioconversion of 19-Nortestosterone by *Rhodococcus* sp. DSM 92-344. 1: Optimization of Transformation Parameters. *Process Biochemistry*, 30(1): 25-34.
- Sanchez L., Barana A. F., (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, 142: 1209-1220.
- Schwartz R.E., Giacobbe R.A., Bland J.A., Monaghan R.L., (1989). L- 671329, a new antifungal agent. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.*, 42: 163-167.
- Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh. T.R., (2001). - Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17: 431-437.
- Sejiny M.J., (1991). Growth phases of some antibiotics producing *Streptomyces* and their identification. *J. K. A. U. Sci*, 3: 21-29.
- Selvin J., Shanmughapriya S., Gandhimathi R., Seghal K.G., Rajeetha R.T., Nataraja S.K. and Hema T.A. (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 435-455.
- Seong N. C., (2001). An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. *The Journal of Microbiology.*, 39: 17-23.
- Shirling EB., Gottlieb D., (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*; 16: 313-40.
- Silva CJSM, Roberto IC., 2001. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. *Proc Biochem* (36):1119–24.

Singh L.S., Mazumder S. et Bora T.C., 2009. Optimisation de la croissance et de la production de métabolite bioactive par *Streptomyces tanashiensis* souche A2D, un *actinomycete alcaliphile* et tolérant au sel. *J. Mycol. Med.* 19: 225-233.

Simon P., Meunier R., (1970). Microbiologie industrielle et génie biochimique. 452p.

Simonetti N., Strippoli V., (1971). Azione della metilpatricina sulfa *Candida albicans*. *Antibiotica.* 9: 5-19.

Singh L.S., Mazumder S. et Bora T.C., (2009). Optimisation de la croissance et de la production de métabolite bioactive par *Streptomyces tanashiensis* souche A2D, un *actinomycete alcaliphile* et tolérant au sel. *J. Mycol. Med.* 19: 225-233.

Singleton P., (1994). Bactériologie. Ed., Masson. France.

Smaoui S., (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. en vue de l'obtention du doctorat .Toulouse : 22p.

Solanki R., Khanna M. and Lal L. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian. J. Microbiol.* 48: 410-431.

Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A., (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Central European Journal of Biology*, 7: 373-390.

Souagui Y., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C., Kecha M., (2015). Optimisation de la production d'antifongiques par un actinomycète alcalophile et halotolérant, *Streptomyces* sp. SY-BS5, en utilisant la méthodologie des surfaces de réponses. *J. mycologie médicale*.

Srivibool. R. et Sukchotiratana. M.; Bio perspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 28(3) 493-499 (2006).

Stackebrandt E., Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L., (1997). A proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 479-491.

Stackebrandt E. and Gorbel B.M., (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present spaces definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 846-849.

Stackebrandt E. and Woese C.R., (1981). The evolution of prokaryotes. *Symposia of the Society for General Microbiology*, 32: 1-31.

Strub C., (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 203p.

Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y. and Suzuki Y., (1994). Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 8: 122-127.

T Takizawa M.; Colwell R. R., Hill R. T., (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chasapeake. Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 997-1002.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. et Kumar S., (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.

Teruel MLA, Gontier E, Bienaime C, Saucedo JEN, Barbotin JN., 1997. Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme Microbial Technol* (21) : 314–20.

Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K, and Bora T.S., (2007). Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Med Microbiol.*, 17: 242-249.

Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425.

Tomita K., Nishito M., Sitoh K., Yamamoto H., Hashino Y., Okhuma H., Konishi M., Miyaki T. et Oki T., (1990). Pramycin A, B and C: new antifungal antibiotics. I. Taxonomy, production and physico-chemical properties. *J. Antibiot.* 43: 755-762.

Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L., (2012). Introduction à la microbiologie. Edition de Renouveau pédagogique ; quebec : 152-408.

Toumatia O., (2015). Etude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de doctorat. Université d'Alger. 266p.

Toumatia O., Yekkour A., Goudjal Y., Riba A., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Zitouni A., (2014). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *J. Basic. Microbiol*, 54: 1-8.

Tresner H.D., Davies M.C. and Backus E.J., (1961). Electron microscopy of *Streptomyces* spores morphology and its role in species differentiation. *Journal of Bacteriology*, 81: 70–80.

Trujillo M.E. and Goodfellow M., (1997). Polyphasic taxonomic study of clinical significant actinomadura including the description of *Actinomadura Latina* sp. *Nov Zentralbl. Baketriol.*, 285: 212-233.

Tsuboya S., Takayuki D., Takenori I. and Kenj H., (1996). Substance P antagonists manufacture with microorganism. *Jp n. Kokai Tokkyo Koho.*, p.16.

U Umezawa H., (1988). Low molecular-weight enzyme inhibitors and immunomodifiers. In: Actinomycetes in biotechnology. Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M (Eds.). London: Academic Press, p. 285-325.

V

Valanarasu M., Kannan P., Ezhilvendan S., Ganesan G., Ignacimu-thu S., Agastian P., (2010). Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. *J. Mycol. Med.*, 20: 290-297.

Valanarasu M., Duraipandiyan V., Agastian P., Ignacimuthu S., (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J. Mycol. Med.*, 19: 22-8.

Valan Arasu M., Duraipandiyan V., Agastian p. and Ignacimuthu S., (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J. Mycol. Méd.* 18: 147-153.

Van Bambeke V and Tulkens P., (2008). Pharmacologie et Pharmacothérapie Antiinfectieuse. *Syllabus national belge de pharmacologie*.

Vandamme E.J., (1985). Biotechnology of industrial antibiotics. Drug and pharmaceutical sciences. Vol. 22. New-York. Marcel Dekker. p 808.

Vandeputte V., (2008). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *candida glabrata*. Thèse de Doctorat. University d'Angers (France), p 168.

Vijayakumar R., Panneerselvam K., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A. and Saravanamuthu R. (2010). Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated From Palk Strait, East Coast of India. *Indian. J. Microbiol*

Vijayakumar R., Muthukumar C., Thajuddin N., Panneerselvam A., and Saravanamuthu R., (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India.

Vilches. C; Mendez. C; Hardission. C; Salas. JA. (1990). Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. *J. Gen. Microbiol*, 136, 1447-54.

W

Waksman S.A., (1967). Distribution, isolation and methods of study. In: The actinomycetes- a summary of current knowledge. The ronald Press Company. New york. pp: 9-21.

Waksman S.A., (1963). Ma vie avec les microbes. Albin. Michel (ed.), 280 p.

Waksman. S.A., (1961). Classification, identification and description of genera and species in the actinomycetes. Vol II. The Williams and Willkins. Co, Baltimore.

Walsh T.J., Jackson A.J., Lee J.W., Amantea M., Sein T., Bacher J. and Zeck L., (2000). Dose dependent pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex in rabbits. *Antimicrob. Agents. Ch.* 44 (8): 2068 2076.

Walsh T.J. and Giri N., (1997). Pradimicins: a novel class of broad-spectrum antifungal compounds. *European journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16: 93-97.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D.,2001- How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Arch Microbiol*, 176(5): 386p.

Wayne L., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H. Moore W. E. C., Murray R. G. E., Stackbrandt E., Starr M. P., Truper H. G., (1987). Report from the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic, *Int J. Syst. Bacteriol*, 37: 463-464.

Wen-Jun Li., Dong-Jin Park., Shu-Kun Tang., Dong Wang., Jae-Chan Lee., Li-Hua Xu, Chang-Jin Kim and Cheng-Lin Jiang.(2004). *Nocardiosis salina sp. nov.*, a novel halophilic actinomycete isolated from saline soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1805-1809.

Wijitra A., Somboon T., Surattana A. and Khanit S., (2006). Identification and antimicrobial activities of actinomycetes from soils in Samed Island, and geldanamycin from strain PC4 – 3. *Thai J. Pharm. Sci.*, 30: 49-56.

Williams S.T., Lanning S., Wellington E.M.H., (1984). Ecology of *Actinomycetales*, p. 481-528. In: "The Biology of Actinomycetes" Goodfellow M., Moradasski M. and Williams S.T. (Eds.), Academic Press. London.

Williams S.T., Wellington E. M. H., (1982). Principales and problems of selective isolation of microbes. In: Bioactive microbial products: Search and discovery. Academic Press, London. 9-26.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J., (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera.

Wu C., Zhu H., van Wezel G. P., Hae Choi Y., (2016). Metabolomics-guided analysis of isocoumarin production by *Streptomyces* species MBT76 and biotransformation of flavonoids and phenylpropanoids. *Metabolomics* 12:90 10.1007/s11306-016-1025-6.

X

Xianoyong Z., Jinyan Z., Wen F., Zhidong L., Juan Z., Jie Y., Liang X. and Hong T., (2010). Response surface methodology used for statistical optimization of jjeanpeptide production by bacillus subtilis. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13(4):1-7.

Y

Yamaguchi T., (1965). Comparison of the Cell-Wall Composition of Morphologically Distinct Actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 89 (2): 444-453.

Yang X.F., Qiu D.W., Yang J.H. and Liu Z. (2006). Effect of fermentation condition on antibiotic production of *Xenorhabdus nematophilus*. *J. Clin. Microbiol*. 28:12 16.

You. M.K, and Park Y.K., (1996). A new method for the selective isolation of actinomycetes from soil. *Biotechnology Techniques*, 10 (7): 541 - 546.

Young H.P., Chung T.W., Han M.H. (1980). Studies on the microbial glucose isomerase: (4). Characteristics of immobilized whole-cell glucose isomerase from *Streptomyces* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, 2: 227-233.

Yu J., Liu Q., Liu Q., Liu X., Sun Q., Yan J., Qi X., Fan S., (2008). Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology*, 99: 2087-2091.

Z

Zaitlin B., and Watson S.B., (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. 40 (9): 1741-1753.

Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005). *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*, 156: 984-993.

Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A., (2004b). Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *Journal of Antibiotics*, 57: 367-372.

Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. and Labeda D.P., (2004a). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1377-1381.

Annexes

1. Analyses physico-chimiques

1.1. Mesure du pH

La mesure du pH s'effectue sur une suspension de terre fine, et le rapport liquide/poids de terre doit être constant (Aubert, 1978).

1.2. Mesure de la conductivité électrique (C.E.)

La mesure de conductivité permet d'obtenir rapidement une estimation de la teneur globale en sels dissous. De plus la connaissance de la conductivité est nécessaire pour l'étude du complexe absorbant des sols salés (Aubert, 1978).

1.3. Humidité du sol

Elle correspond à la teneur en eau d'un échantillon de sol à un moment donné, notamment au moment où a été réalisé le prélèvement (Aubert, 1978).

1.4. Analyse granulométrique rapide de la terre fine (la texture)

La séparation des différentes classes s'effectue par sédimentation gravitaire pour les fractions fines (<0,08 mm) et par tamisage à sec après lavage pour les fractions supérieures en utilisant une série de tamis (1 mm, 0,4 mm, 0,2 mm, 0,1 mm et 0,08 mm) (Dupain et al. 1955).

1.5. Dosage du carbone organique par la méthode Anne

Le principe consiste à l'oxydation de la matière organique d'un échantillon de sol par un excès de dichromate de potassium en milieu sulfurique à ébullition et la titration en retour de l'excès de dichromate de potassium en présence d'un indicateur.

Les résultats s'expriment souvent en % ou ‰ ; connaissant le % de C, le taux de matières organiques peut être approximativement obtenu par la formule :

$$\text{M.O. \%} = \% \text{ de C} \times 1,72 \text{ (Aubert, 1978).}$$

1.6. Dosage du calcaire total du sol (calcimètre de Bernard)

Le principe consiste à utiliser la propriété du carbonate de calcium à se décomposer sous l'action d'un acide (acide chlorhydrique, HCl) en H₂O et CO₂. Le volume de CO₂ dégagé est mesuré dans un tube gradué étanche, par la variation de niveau d'une colonne d'eau. La réaction est la suivante : $\text{CaCO}_3 + 2\text{HCl} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CaCl}_2$.

Une molécule-gramme de CaCO₃ (100 g) donne 22.4 l de CO₂ à pression normale et 0°C. Dans les mêmes conditions, 1 litre de gaz carbonique est engendré par 4.5 g de CaCO₃ (règle de 3). On en déduit que 100 ml de CO₂ sont fournis par 0.45 g de CaCO₃, ce qui permet de calculer toutes teneurs en CaCO₃ par rapport au volume de gaz, pour autant que l'appareil ait été étalonné en fonction de la température et de la pression atmosphérique.

Expression des résultats :

La teneur du carbonate de calcium est exprimé en % et obtenue à partir de la formule :

$$\text{CaCO}_3 \% = \frac{P \times V}{P \times v} \times 100. \text{ (Aubert, 1978)}$$

1. Milieux d'isolement• **M2 (milieu Williams et Kuster) (Williams et Kuster, 1964)**

Amidon	10g
caséine	0,3g
KNO ₃	2g
NaCl	2g
K ₂ HPO ₄	2g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,05g
CaCO ₃	0,02g
FeSO ₄ ,7H ₂ O	0,01g
Agar	15g
glucose	1g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
pH	7,2

• **Gélose à l'extrait de malt (GLM)**

Glucose	10g
extrait de levure	3g
extrait de malt	3g
peptone	5 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
pH	7,2

• **Bennett**

D-Glucose anhydre	10g
Casaminoacides	2g
Extrait de levure	1g
Extrait de viande	1g
Agar	15g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
pH	7,2

• **glucose asparagine (GA)**

Glucose	10g
Asparagine	0,5g
K ₂ HPO ₄	0,5g
Agar	15g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
pH	6

2. Milieux d'identification (Sherling et Gottlieb, 1966)

- **ISP1 (Tryptone-extrait de levure-agar ou Tryptone-yeast extract-agar) :**

Tryptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Agar	20 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
pH	7,2

- **ISP2 (Extrait de levure-extrait de malt-agar ou Yeast extract- malt extract-agar)**

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
pH	7,2

- **ISP3 (Farine d'avoine-agar ou oatmeal-agar)**

Farine d'avoine	20 g
Solution saline standard	1 ml
Agar	18 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
pH	7,2

Solution saline standard

FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Eau distillés q.s.q	100 ml

- **ISP4 (Amidon-sels minéraux-agar ou Inorganic salts-starch-agar)**

Solution I

Amidon	10 g
Eau distillés q.s.q	500 ml

Solution II

K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Eau distillés q.s.q	500 ml
pH	7,2

Après dissolution, les deux solutions sont mélangées, 20 g d'agar sont ensuite ajoutés.

- **ISP5 (Glycérol-asparagine-agar)**

L-asparagine	1 g
Glycérol	10 g
Phosphate bipotassique anhydre	1 g

Solution saline standard	1 ml
Eau distillés q.s.q	1000ml
Agar	20 g

- **ISP6 (Peptone-extrait de levure-sel ferrique-agar ou peptone-yeast extract-iron-agar)**

Peptone bactériologique	20 g
Citrate ferrique d'ammonium	0,5 g
Phosphate bipotassique	1 g
Thiosulfate de sodium	0,08 g
Extrait de levure	1 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
Agar	15 g

- **ISP7 (Tyrosine-agar)**

Glycerol	15 g
L-tyrosine	0,5 g
L-asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
Solution saline standard	1 ml
Eau distillés q.s.q	1000 ml
Agar	20 g

Ainsi que le milieu GYEA (Glucose-yeast extract-agar), dont la composition est la suivante selon **Athalye et al., (1981)** :

Extrait de levure	10 g
Glucose	10 G
Agar	18 g
Eau distillés q.s.q	1000 ml
PH	6,8

3. Milieux utilisés pour l'activité antimicrobienne

- **Milieu Sabouraud**

Glucose	20 g
Peptone	10 g
Agar	20g
Eau distillée	1000 ml
PH	6.5

- **Milieu Muller Hinton**

infusion de viande de bœuf	300,0 ml
----------------------------	-------	----------

peptone de caséine	17,5 g
amidon	1,5 g
agar	17,0 g
pH	7,4

2. Révélateurs chimique utilises pour les antibiotiques

2.1. Diphénylamine-aniline : Révélateur des glucides

* Solution à vaporiser : dissoudre 4 g de diphénylamine, 4 ml d'aniline et 20 ml d'acide phosphorique dans 200 ml d'acétone

* Traitement complémentaire : chauffer pendant 5 min à 100°C. Les taches apparaissent roses, violettes ou bleues.

2.2. Chlorure de fer ferrique (FeCl₃) : Révélateur des phénols et des acides hydroxamiques

*Solution de vaporisation : solution de FeCl₃ de 1 à 5% dans HCl 0,5 N. Les taches correspondant aux phénols sont colorées au bleu vert et celles des acides hydroxamiques, rouge.

2.3. Ninhydrine : Révélateur des amines, des acides aminés et des osamines

* Solution de vaporisation : dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'acétone.

* Traitement complémentaire: chauffer à 105 °C jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette, rose).

2.4. Formaldéhyde - acide sulfurique: révélateur des aromatiques polycycliques

* Solution de vaporisation: dissoudre 0,2 mL d'une solution de formaldéhyde (37%) dans 10 mL de H₂SO₄ concentré. Les taches apparaissent de diverses couleurs (brunes, blanchâtres, etc.).

2.5. Réactif de Tollens: révélateur des substances réductrices

* **Solution a** : solution de nitrate d'argent 0,1 mol/l.

* **Solution b** : ammoniacque 5 mol/l.

* **Solution de vaporisation** : avant emploi, mélanger 1 volume de a et 5 volume de b.

* Traitement complémentaire : chauffer pendant 5 à 10 min à 105°C jusqu'à la coloration foncée maximale des tâches.

1. Classification des Actinobactéries

Tableau XXIV. Classification des Actinobactéries (Goodfellow, 2012).

Classe	Ordre	Famille	Genre
Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces, Actinobaculum, Arcanobacterium, Mobiluncus, Varibaculum</i>
	Actinopolysporales	Actinopolysporaceae	<i>Actinopolyspora</i>
	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium, Aeriscardovia, Alloscardovia, Gardnerella, Metascardovia, Parascardovia, Scardovia</i>
	Catenulesporales	Catenulesporaceae	<i>Catenulespora</i>
		Actinospicaceae	<i>Actinospica</i>
	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium, Turicella</i>
		Dietziaceae	<i>Dietzia</i>
		Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>
		Nocardiaceae	<i>Nocardia, Gordonia, Millisia, Rhodococcus, Skermania, Smaragdiococcus, Williamsia</i>
		Segniliparaceae	<i>Segniliparus</i>
		Tsukamurellaceae	<i>Tsukamerulla</i>
	Frankiales	Frankiaceae	<i>Frankia</i>
		Acidothrmaceae	<i>Acidothrmus</i>
		Cryptosporangiaceae	
		Geodermatophilaceae	<i>Geodermatophilus, Blastococcus, Modestobacter</i>
		Nakamurellaceae	<i>Nakamurella, Humicoccus</i>
	Glycomycetales	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces, Stackebrandtia</i>
	Jiangellales	Jiangellaceae	<i>Jiangella, Haloactinopolyspora</i>
	Kineosporiales	Kineosporiaceae	<i>Kineospora, Kineococcus, Quadrisphaera</i>
	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus, Acaricomes, Arthrobacter, Citicoccus, Kocuria, Nesterenkonja, Renibacterium, Rothia, Yaniella, Zhihengliuella</i>
		Beutenbergiaceae	<i>Beutenbergia, Miniimonas, Salana, Serinibacter</i>
		Bogoriellaceae	<i>Bogoriella, Georgenia</i>
		Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>
		Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas, Oerskovia, Tropheryma</i>
		Dermabacteraceae	<i>Dermabacter, Brachybacterium</i>
		Dermacoccaceae	<i>Dermacoccus, Demetria, Kytococcus</i>
		Dermatophilaceae	<i>Dermatophilus, Kineosphaera, Intrasporangium, Arsenicococcus, Humihabitans, Janibacter, Knoellia, Kribbia, Lapillicoccus, Ornithinicoccus, Ornithinimicrobium, Oryzihumus, Phycococcus, Serinicoccus, Terrabacter, Terracoccus, Tetrasphaera</i>
Jonesiaceae		<i>Jonesia</i>	
Microbacteriaceae			

Classe	Ordre	Famille	Genre
		Promicromonosporaceae	<i>Promicromonospora</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> <i>Isoptericola</i> , <i>Myceligenerans</i> <i>Xylanibacterium</i> , <i>Xylanimicrobium</i> <i>Xylanimonas</i> , <i>Rarobacter</i>
		Runaniaceae	<i>Ruania</i> , <i>Haloactinobacterium</i> , <i>Sanguibacter</i>
	Micromonosporales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinocatenispora</i> <i>Actinoplanes</i> , <i>Asanoa</i> , <i>Catellatospora</i> <i>Catenuloplanes</i> , <i>Couchioplanes</i> <i>Dactylosporangium</i> , <i>Krasilnicovia</i> <i>Longispora</i> , <i>Luedemanilla</i> , <i>Pilimelia</i> <i>Polymorphospora</i> , <i>Salinispora</i> , <i>Spirilliplanes</i> <i>Verrucosispora</i> , <i>Virgisporangium</i>
	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	<i>Propionibacterium</i> , <i>Aestuariiimicrobium</i> <i>Brooklawnia</i> , <i>Friedmanniella</i> , <i>Granulicoccus</i> <i>Luteococcus</i> , <i>Microplunatus</i> , <i>Micropruina</i> , <i>Propioniticella</i> , <i>Propionicimonas</i> <i>Propioniferax</i> , <i>Propionimicrobium</i> <i>Tessaracoccus</i>
		Nocardiodaceae	<i>Nocardioides</i> , <i>Actinopolymorpha</i> <i>Aeromicrobium</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Marmoricola</i>
	Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae	<i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinoalloteichus</i> <i>Actinokineospora</i> , <i>Actinosynnema</i> <i>Amycolatopsis</i> , <i>Crossiella</i> , <i>Coodfellowiella</i> <i>Kibdelosporangium</i> , <i>Kutzneria</i> , <i>Lechevalieria</i> , <i>Lentzea</i> , <i>Prauserella</i> <i>Saccharomonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i> <i>Saccharothrix</i> , <i>Streptoalloteichus</i> <i>Thermocrisum</i> , <i>Umezaweae</i>
	Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>
	Streptosporangiales	Streptosporangiales	<i>Streptosporangium</i> , <i>Acrocarpospora</i> <i>Herbidospora</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i> <i>Planobispora</i> , <i>Planomonospora</i> <i>Planotetraspora</i> , <i>Sphaerisporangium</i> <i>Thermopolyspora</i>
		Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i> , <i>Haloactinospora</i> , <i>Streptomonospora</i> , <i>Thermobifida</i>
		Thermomonosporaceae	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinocorallia</i> <i>Actinomadura</i> , <i>Spirillospora</i> , <i>Thermobispora</i>
Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	<i>Acidimicrobium</i> , <i>Ferrimicrobium</i> , <i>Ferrithrix</i>
Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	<i>Coriobacterium</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Collinsella</i> <i>Cryptobacterium</i> , <i>Denitrobacterium</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Olsenella</i> , <i>Slackia</i>
Rubrobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	<i>Rubrobacter</i>
Thermoleophilia	Thermoleophilales	Thermoleophilaceae	<i>Thermoleophilum</i>
	Solirubrobacterales	Solirubrobacteraceae	<i>Solirubrobacter</i>
		Conexibacteraceae	<i>Conexibacter</i>
		Patulibacteraceae	<i>Patulibacter</i>

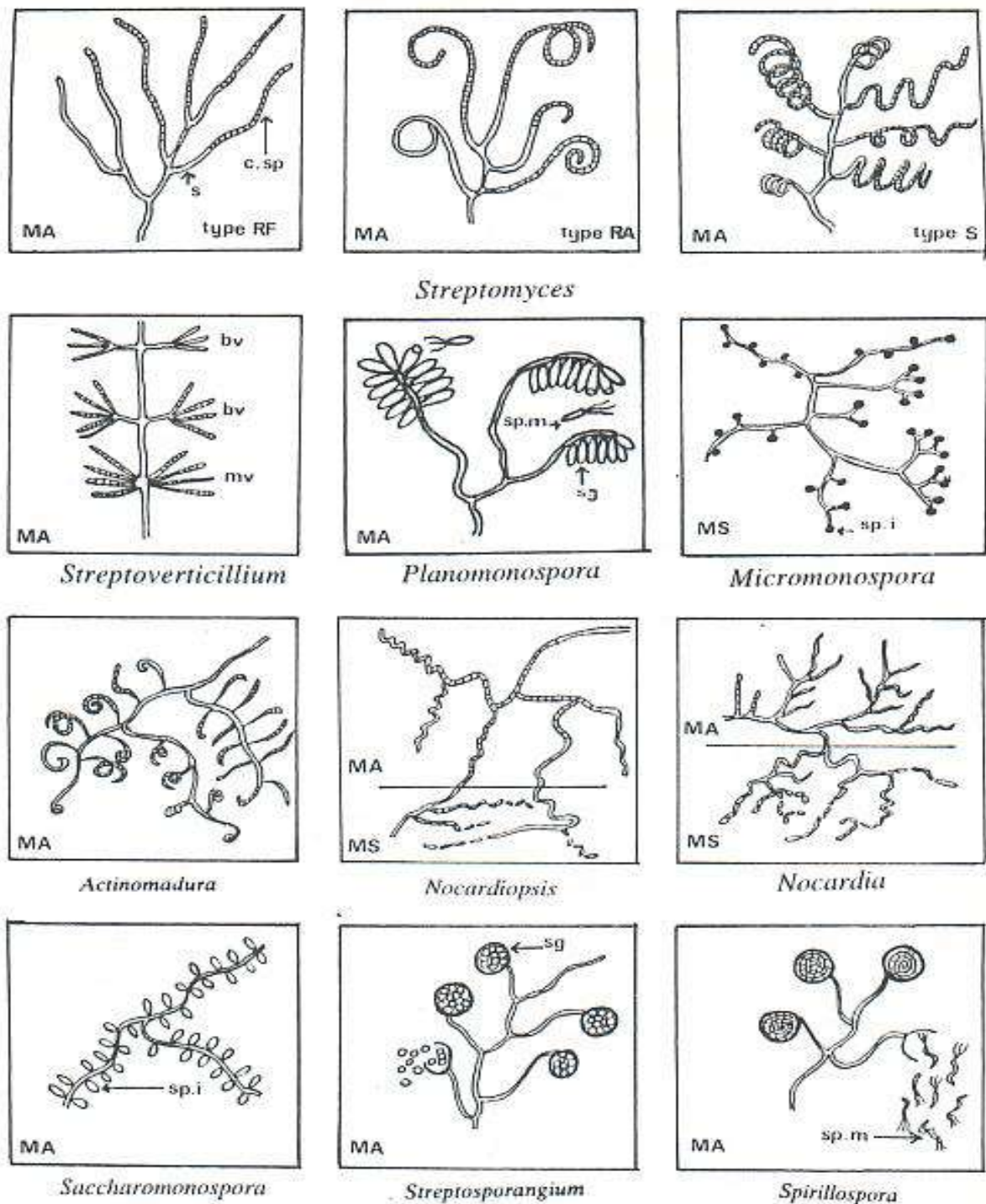


Figure 37. Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (Bergey, 1989).

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 isolés; sp.m., spores mobiles; sg, sporanges.

2. Clés d'identification des Actinobactéries

Tableau XXV. Clé d'identification des principaux genres d'Actinobactéries.

DAP	caractéristiques chimiques					caractéristiques morphologiques	genres
	glycine	sucres	acides mycoliques	Phospho-lipides (P)	ménaquinones (MK)		
LL	+	NC	-	PII	MK9 (H6,H8)	chaînes de spores sur MA	<i>Streptomyces</i>
LL	+	NC	-	PI	MK8 (H4)	MA et MS fragmentés	<i>Nocardioïdes</i>
LL	+	NC	-	PIII	MK9 (H4)	MA (-), sporanges sur MS avec une spore	<i>Kineosporia</i>
DL	+	xyl.-arab.	-	PII	MK9 (H4),10(H4)	MA (-), spores isolées sur MS	<i>Micromonospora</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4),10(H8)	MA (-), chaînes de spores sur MS	<i>Catellatospora</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4),10(H4)	MA (-), sporange globuleux avec nombreuses spores mobiles	<i>Actinoplanes</i>
DL	+	" "	-	PII	MK9 (H4,H6,H8)	MA (-), sporange en masse avec peu de spores mobiles	<i>Dactylosporangium</i>
DL	+	" "	-	PI	MK9 (H4), 10(H4)	MA (-), chaînes de spores non mobiles	<i>Glycomyces</i>
DL	-	madurose	-	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>Microtetraspora</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>Planobispora</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.	+	PII	MK8 (H4),9(H2)	MA(+), MA et MS fragmentés	<i>Nocardia</i>
DL	-	" "	+	PII	MK8 (H4),9(H2)	MAv (-), cycle mycélium-batonnet-cocci	<i>Rhodococcus</i>
DL	-	" "	-	PII	MK9 (H2,H4)	MA (+), MA et MS fragmentés	<i>Amycolatopsi</i>
DL	-	" "	-	PII	MK9 (H4)	MA (+), spores isolées sur MA	<i>Saccharomonosporas</i>
DL	-	" "	-	PIII	MK9 (H4)	MA (+), chaînes de spores sur MA	<i>Saccharopolyspora</i>
DL	-	Rham.-gal.	-	PII, PIV	MK9 (H'), 10(H4)	MA (+), chaînes de spores sur MA fragmenté	<i>Saccharothrix</i>
DL	-	NC	-	PIII	MK10 (H2,H4,H6)	MA (+), chaînes de spores sur MA fragmenté	<i>Nocardioopsis</i>
DL	-	NC	-	PII, PIV	MK9 (H2,H4), 10(H4,H6)	MA (+), spores isolées sur MA	<i>Thermomonospora</i>
DL	-	NC	-	ND	MK7 et MK9	MA (+), endospores isolées sur MA et MS	<i>Thermoactinomyces</i>

Note: DAP, acide diaminopimélique; NC, non caractéristique; ND, non déterminé; arab., arabinose; gala., galactose; 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 phospholipide 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).

Souche ITA1 sur milieu Bennett

Tableau XXVI. Analyse statistique des effets de variables (composants de milieu Bennet) de la souche *Streptomyces fradiae* ITA1 sur l'activité antibactérienne utilisant la conception de Plackett-Burman.

RunOrder	Block	Casam	E. levure	E. viande	AB
1	1	1	1,0	1,4	0
2	1	1	0,6	1,0	15
3	1	3	1,0	0,6	15
4	1	3	1,0	1,4	18
5	1	2	1,0	1,0	16
6	1	2	1,0	1,0	33
7	1	3	0,6	1,0	16
8	1	2	1,4	1,4	19
9	1	3	1,4	1,0	19
10	1	2	1,4	0,6	16
11	1	1	1,0	0,6	17
12	1	1	1,4	1,0	14
13	1	2	1,0	1,0	19
14	1	2	0,6	0,6	12
15	1	2	0,6	1,4	10

Tableau XXVII. Estimations de l'effet de production d'antibiotique à partir du résultat de " Box-Behnken " de *Streptomyces fradiae* ITA1 sur le milieu Bennet.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		25,088	0,528	47,53	0,000	
Casaminoacide	2,196	1,098	0,473	2,32	0,021	1,32
E. levure	3,577	1,788	0,402	4,45	0,000	1,02
E. viande	-0,009	-0,004	0,498	-0,01	0,993	1,39
Casaminoacide*Casaminoacide	-7,977	-3,988	0,624	-6,39	0,000	1,23
E. levure*E. levure	-10,191	-5,096	0,613	-8,31	0,000	1,19
E. viande*E. viande	-10,819	-5,410	0,613	-8,82	0,000	1,17
Casaminoacide*E. levure	1,783	0,892	0,546	1,63	0,104	1,01
Casaminoacide*E. viande	3,585	1,793	0,783	2,29	0,023	1,56
E. levure*E. viande	2,609	1,304	0,590	2,21	0,028	1,04

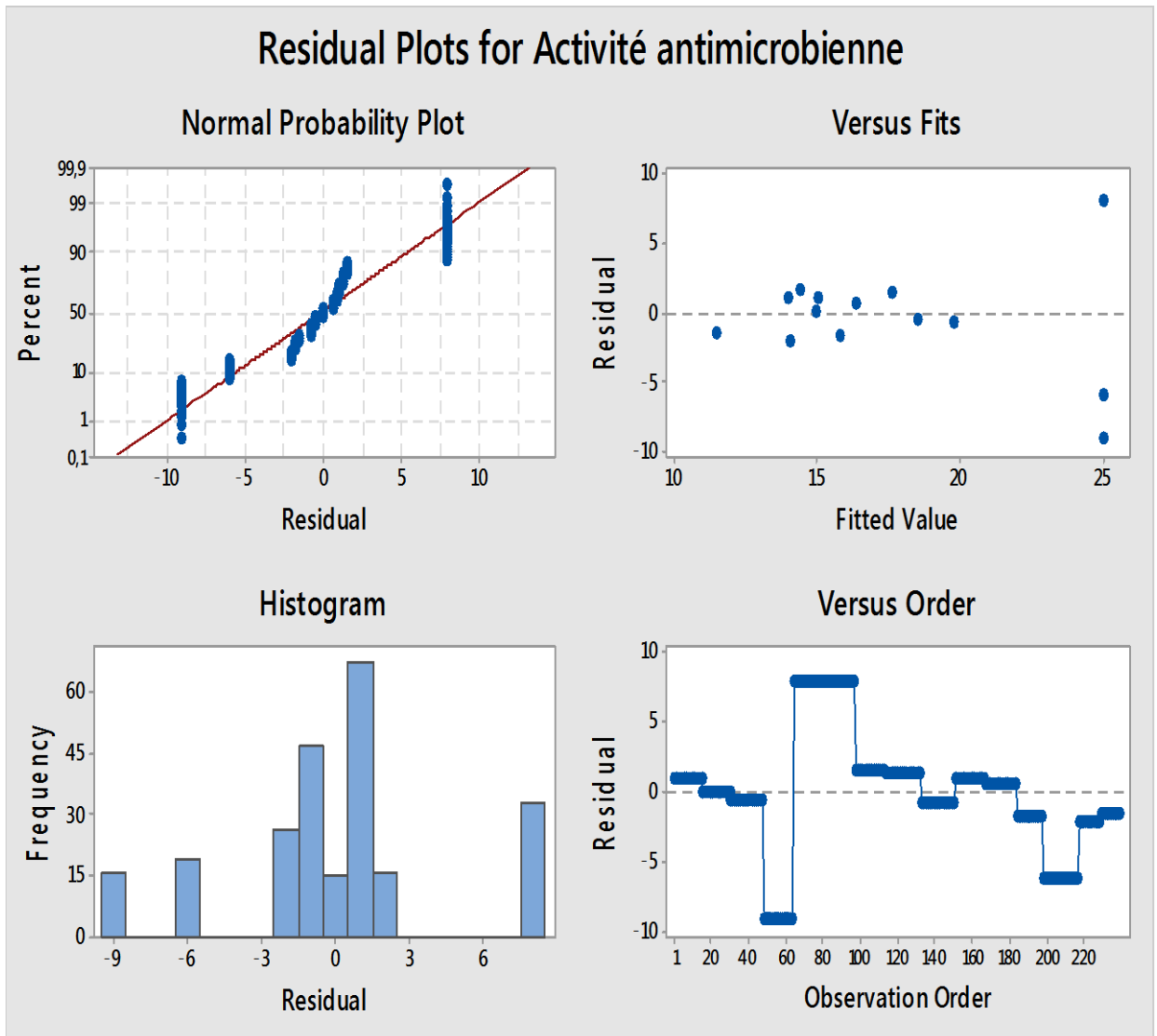


Figure 38. Parcelles résiduelles de l'activité antibactérienne de *S. fradiae* ITA1 sur le milieu Bennett.

Souche I4 sur milieu M2

Tableau XXVIII. Analyse statistique des effets de variables (composants de milieu M2) de la souche *Streptomyces sp.* I4 sur l'activité antibactérienne utilisant la conception de Plackett-Burman.

RunOrder	Block	Caseine	Amidon	NaCl	Activité Micro
1	1	0,3	10	2	20
2	1	0,2	10	1	22
3	1	0,2	6	2	21
4	1	0,3	10	2	22
5	1	0,4	6	2	24
6	1	0,2	10	3	20
7	1	0,4	14	2	17
8	1	0,3	14	3	27
9	1	0,3	6	1	25
10	1	0,2	14	2	30
11	1	0,3	10	2	15
12	1	0,4	10	1	18
13	1	0,3	6	3	11
14	1	0,4	10	3	17
15	1	0,3	14	1	16

Tableau XXIX. Estimation de l'effet de production d'antibiotique à partir du résultat de " Box-Behnken " de *Streptomyces sp.* I4 sur le milieu M2.

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	50,625	20,189	2,508	0,054
Caseien	-31,250	86,745	-0,360	0,733
Amidon	-2,656	1,959	-1,356	0,233
NaCl	-11,125	7,074	-1,573	0,177
Caseien*Caseien	175,000	128,006	1,367	0,230
Amidon*Amidon	0,141	0,080	1,758	0,139
NaCl*NaCl	-1,500	1,280	-1,172	0,294
Caseien*Amidon	-10,000	3,075	-3,252	0,023
Caseien*NaCl	2,500	12,298	0,203	0,847
Amidon*NaCl	1,563	0,307	5,082	0,004

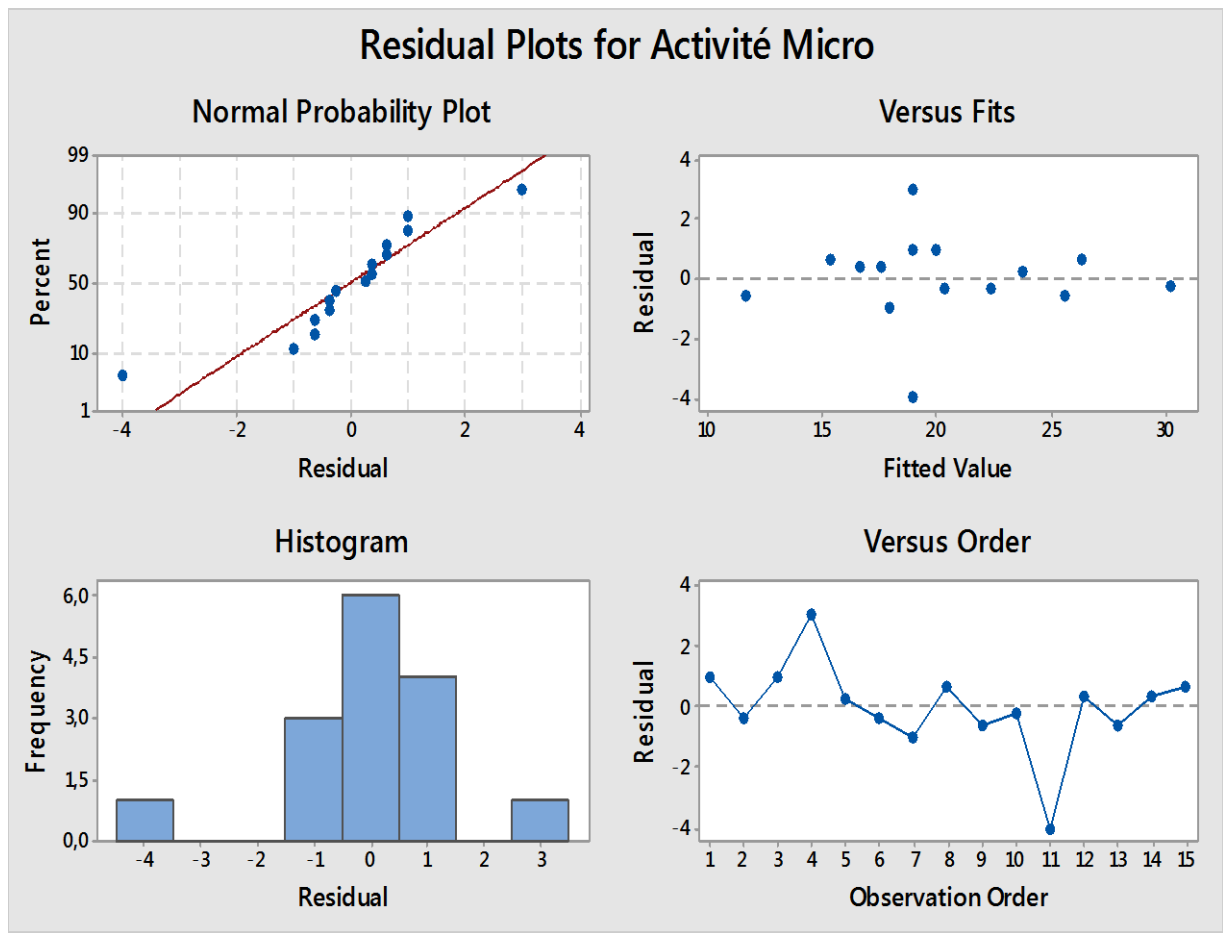


Figure 39. Parcelles résiduelles de l'activité antibactérienne de *Streptomyces sp.* I4 sur le milieu M2

ملخص

تهتم هذه الدراسة بعزل وتصنيف بعض سلالات البكتيريا الشعاعية (الأكتينوبكتيريا)، فضلا عن خصائصها الحيوية، بالإضافة إلى استخراج والتصنيف الجزئي للمضادات الحيوية المفروزة.

تم عزل ما مجموعه 112 سلالة من الأكتينوبكتيريا من تربة تنتمي إلى ثلاثة أنظمة إيكولوجية لمنطقة ورقلة: مزرعة نخيل، شط وسبخة. عزلتان سميتا ITA1 و I4 تم اختيارهما لأهمية خصائصهما الحيوية ضد 16 جرثوم مستهدف. التصنيف التقسيمي متعدد الأطوار على أساس التحليل الشكلي (المورفولوجية) مكونات الجدار (كيموتصنيفية)، الفسيولوجية و الجزيئية ساعد على تصنيف العزلة ITA1 إلى نوع *S. fradiae*، و العزلة I4 إلى جنس *Streptomyces sp.* الحركية الإنتاجية للمضادات الحيوية تكشف أن الحد الأقصى للإنتاج يكون في اليوم 5-6 من الحضانة بالنسبة ل ITA1 و في اليوم 6 من الحضانة بالنسبة ل I4. تحسين إنتاج المضادات الحيوية من سلالة I4 على الوسط M2 يكشف أن الوسط النهائي المحسن يحتوي على : 0.2 غرام / لتر من الكازيين، 14 غرام / لتر من النشا القابلة للذوبان، 3 غرام / لتر من كلوريد الصوديوم، وأن النشاط يزداد إلى 33 مم بدلا من 18 مم في البيئة غير المحسنة. وأظهرت تحسين وسط Bennett أن الوسط النهائي المحسن يحتوي على : حمض casaminoacide = 2.1717 غرام / لتر، مستخلص الخميرة = 1.0768 غرام / لتر و مستخلص اللحم = 1.0202 غرام / لتر. استخراج المضادات الحيوية المفروزة من السلالتين المختلفة تبين أن بيوتانول هو أفضل مذيب بالنسبة ل ITA1 والهكسان بالنسبة ل I4. التصنيف الجزئي ب CCM أظهر أن أفضل نظام للفصل هو (6 / 1.5 / 2) BAEM، وأظهرت الكواشف الكيميائية وجود جزيئات الكربوهيدرات والبروتين في المضادات الحيوية لسلالة ITA1، ووجود جزيئات الكربوهيدرات في المضادات الحيوية لسلالة I4. كشفت ال bioautography وجود بقع نشطة في مستخلصات السلالتين.

كلمات مفتاحية: الأكتينوبكتيريا، صحراء، ورقلة، *Streptomyces*، تصنيف، نشاط مضاد حيوي، ماس (منهجية استجابة السطح)، مضادات حيوية.

Résumé

La présente étude s'intéresse d'une part à l'isolement et taxonomie de quelques souches d'actinomycètes (*Actinobacteria*) et d'autres parts à leurs propriétés antagonistes, l'extraction et la caractérisation partielle des antibiotiques sécrétés.

Un total de 112 souches d'actinobactéries ont été isolées à partir de sols provenant de trois écosystèmes de la région de Ouargla : il s'agit d'une palmeraie, d'un Chott et d'une Sebkha. Deux isolats codés ITA1 et I4 ont été sélectionnés pour leurs propriétés antagonistes importantes vis-à-vis de 16 germes cibles. L'identification taxonomique par une approche polyphasique basée sur les analyses morphologiques, chimiotaxonomiques, physiologiques et moléculaires a permis de rattacher la souche ITA1 à l'espèce *S. fradiae*, l'isolat I4 au genre *Streptomyces sp.* La cinétique de production des antibiotiques révèle que la production maximale est au 5 et 6^{ème} jour d'incubation pour ITA1, et au 6^{ème} jour pour I4. L'optimisation de la production d'antibiotique de la souche I4 sur le milieu M2 révèle que le milieu final est optimisé avec : 0.2 g/l de caséine, 14 g/l d'amidon soluble, 3 g/l NaCl, et que l'activité passe à 33 mm au lieu de 18 mm dans le milieu non optimisé. L'optimisation de milieu Bennett a montré que le milieu final est optimisé avec : casaminoacide = 2.1717 g/l, E. levure = 1.0768 g/l et E. viande = 1.0202 g/l. L'extraction des antibiotiques sécrétés par les différentes souches montre que le n-butanol est le meilleur solvant pour ITA1 et l'hexane pour I4. La caractérisation partielle par CCM révèle une meilleure séparation avec le système BAEM (6/1,5/2), la révélation chimique montre la présence de fractions glucidiques et protéiques au niveau des antibiotiques de la souche ITA1, et la présence des fractions glucides dans les antibiotiques de la souche I4. La bioautographie révèle la présence de taches actives dans les extraits des deux souches.

Mots clés : Actinobactéries, Sahara, Ouargla, *Streptomyces*, Taxonomie, activité antimicrobienne, RSM, antibiotiques.

Summary

This study investigates the isolation and taxonomy of a few Actinomycetes (*Actinobacteria*), as well as their antagonistic properties, extraction and partial characterization of the secreted antibiotics.

A total of 112 strains of actinobacteria were isolated from soils from three ecosystems in the Ouargla region: a palm grove, Chott and Sebkha. Two isolates encoded ITA1 and I4 were selected for their important antagonist properties against 16 target germs. The taxonomic identification by a polyphasic approach based on morphological, chemotaxonomic, physiological and molecular analyzes allowed the strain ITA1 to be attached to the species *S. fradiae*, the isolate I4 to the genus *Streptomyces sp.* The production kinetics of antibiotics reveals that the maximum production is on the 5th to 6th day of incubation for ITA1, and on the 6th day for I4. The optimization of the antibiotic production of strain I4 on M2 medium reveals that the final medium is optimized with: 0.2 g/l of casein, 14 g/l of soluble starch, 3 g/l of NaCl, and that the activity increases to 33 mm instead of 18 mm in the non-optimized medium. Optimization of Bennett medium showed that the final medium is optimized with: casamino acid = 2.1717 g/l, E. yeast = 1.0768 g/l and E. meat = 1.0202 g/l. The extraction of the antibiotics secreted by the different strains shows that n-butanol is the best solvent for ITA1 and hexane for I4. The partial characterization by TLC reveals better separation with the BAEM system (6 / 1.5 / 2), the chemical revelation shows the presence of carbohydrate and protein fractions in the antibiotics of the ITA1 strain and the presence of the carbohydrate fractions in The antibiotics of strain I4. Bioautography reveals the presence of active spot in the extracts of the two strains.

Key words: Actinobacteria, Sahara, Ouargla, *Streptomyces*, Taxonomy, antimicrobial activity, RSM, antibiotics.