

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA**  
**RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1**

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHEIOLOGIE CELLULAIRE**



## Mémoire de fin d'étude

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en  
**SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**OPTION: MICROBIOLOGIE-BACTERIOLOGIE**

PAR  
**MELLOUK Imène**

**Thème**

# ISOLEMENT, CARACTERISATION ET ACTIVITE ANTAGONISTE DES ACTINOBACTERIES DE BIOTOPE MARIN

Soutenu le ... /06/2016

Devant le jury composé de:

M <sup>me</sup> HAMAI F.	M.C.A université de Blida 1	Présidente
M <sup>me</sup> AIT SAADI N.	M.A.A université de Blida 1	Examinatrice
M <sup>me</sup> MEKLAT. A	M.C.A université de Blida 1	Promotrice
M <sup>me</sup> CHAABANE CHAUCHE F.	M.A.A E.N.S KOUBA	Co-promotrice

Année universitaire 2015- 2016



## Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier <<Allah>> le tout puissant pour nous avoir accordé la volonté et la patience pour aller jusqu'au bout, pour nous avoir guidé sur le droit chemin tout au long de ce n'aurait pas aboutit.

A **Mr Sabaou Nasserline**, directeur de labo LBSM de Kouba, nous le remercions pour la confiance qu'il nous a accordé en nous accueillant et pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour la réalisation de notre travail, pour sa gentillesse et sa sympathie . Veuillez trouver ici, l'expression de notre profond respect, de notre estime et de notre haute reconnaissance.

A notre perle rare, notre promotrice **Mme Meklat**, Maitre de conférences a à la faculté des sciences de la nature et de la vie .Elle a bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation, vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles.vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration, Nous avons eu le privilège de travailler parmi votre équipement, nous avons apprécié vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marquées. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

A Mme **Chaabane Chaouche Fawzia** notre co-promotrice, nous tenons à la remercier chaleureusement pour nous avoir consacré le temps et mit à notre disposition tout son savoir scientifique, pour nous avoir guidées et orientées et surtout pour les marques de sympathie qu'elle a témoignée à notre égard, qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect et notre reconnaissance.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à M. **Ait Yahia A. MAA** à l'Université Saâd Dahleb de Blida pour son aide dans l'analyse HPLC.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à Mme **Verheecke carol** chercheur à l'ENSAT de Toulouse pour la réalisation de la PCR.

A **Mm Hamaidi F. MCA** à l'Université Saâd Dahleb de Blida pour l'honneur que vous nous avez fait, en acceptant de présider le jury. Veuillez trouver ici, l'expression de notre reconnaissance et de notre respect le plus sincère.

Je remercie Mme **Ait Saadi N. MAA** à l'Université Saâd Dahleb de Blida qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

A tous les membres du laboratoire LBSM, pour leur disponibilité, leurs conseils scientifiques et leur sympathie, notre profond respect et notre reconnaissance.

Enfin, notre profonde reconnaissance à tout personne qui a participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## **Dédicaces**

Au nom d'ALLAH le clément et le miséricordieux salut et paix sur le fidèle message d'Allah

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, abdelkader, et Merrouche Saliha

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez que dieu vos procure bonne santé et longue vie.

A mon fiancé Mohamed Bouhenna, merci pour ton soutien, ton encouragement et tes conseils.

A mes chers et adorable frère et sœurs.

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mes grands parents ainsi qu'à tout membre de ma famille petit et grand.

A toute mes amies, j'oublierai a jamais votre aide et je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A toutes les personnes qui ont participées a l'élaboration de ce travail, a tous ceux que j'ai omis de citer

**Imène**

## Liste des figures

	<b>Page</b>
<b>Figure 1.</b> Micromorphologie de quelques genres d'actinobacteries.	15
<b>Figure 2.</b> Micromorphologie en microscopie optique de l'isolat TA4 cultivé pendant trois semaines à 30 °C sur le milieu ISP2 (G × 400 avec effet de zoom).	31
<b>Figure 3.</b> Micromorphologie en microscopie optique de l'isolat TB1 cultivé pendant trois semaines à 30 °C sur le milieu ISP2 (G × 400 avec effet de zoom).	32
<b>Figure 4.</b> Activité antifongique de quelques souches d'actinobactéries contre <i>Aspergillus carbonarius</i> M333.	34
<b>Figure 5.</b> Activité antibactériennes de la souche TA4 contre <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline 639c (MRSA) et <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (Bs).	34
<b>Figure 6.</b> Macromorphologie montrant le mycélium aérien de l'isolat TA4 poussant sur milieu ISP1 (à gauche), ISP2 (au milieu), Gélose nutritive et Bennett (à droite).	39
<b>Figure 7.</b> Macromorphologie montrant le mycélium de substrat de l'isolat TA4 poussant sur milieu ISP1 (à gauche), ISP2, Gélose nutritive et Bennett (à droite).	39
<b>Figure 8.</b> Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, montrant la relation entre l'isolat TA4 et les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i> . La barre représente une substitution pour 1000 nucléotides. Les valeurs du Bootstrap (supérieures à 50 %) basées sur 1000 analyses sont indiquées au niveau des nœuds de l'arbre.	41
<b>Figure 9.</b> Effet de différentes sources de carbone sur l'activité antibactériennes de la souche TA4 contre <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline 639c.	43
<b>Figure 10.</b> Cinétique de l'évolution de l'activité antibactérienne dans le milieu ISP2 liquide, contre <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline 639c.	44
<b>Figure 11.</b> Cinétique de l'activité antibiotique de la souche TA4 contre <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline 639c par la méthode de diffusion des puits pendant 10 jours.	45
<b>Figure 12.</b> Activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle (A) et au dichlorométhane (B) au 5 <sup>ème</sup> jour d'incubation contre <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline 639c.	45
<b>Figure 13.</b> Profil d'élution en HPLC (obtenue à 220 nm) de l'injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle.	46
<b>Figure 14.</b> Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique A de la souche TA4.	46
<b>Figure 15.</b> Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique B de la souche TA4.	46

## Liste des tableaux

	<b>Page</b>
<b>Tableau 1:</b> Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy <i>et al.</i> , 1987).	10
<b>Tableau 2:</b> Compositions des milieux d'isolement en agents sélectifs.	21
<b>Tableau 3.</b> Distribution des actinobacteries marines dans les prélèvements d'eau côtière analysés sur milieu chitine vitamines agar.	30
<b>Tableau 4.</b> Caractérisation préliminaire des genres des isolats d'actinobacteries marins	31
<b>Tableau 5.</b> Propriétés antagonistes des isolats d'actinobacteries marins.	33
<b>Tableau 6.</b> Caractéristiques physiologiques des isolats TA4.	40
<b>Tableau 7.</b> Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16s de l'isolat TA4 avec les souche-type des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i> .	40
<b>Tableau 8.</b> Effets de source de carbone sur l'activité antibiotique de la souche TA4.	42

## Liste des abréviations

ADN	Acide deoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique
DAB	Acide diaminobutyrique
DAP	Acide diaminopimélique
EDTA	Ethylene diamine tetracyclic acid
ISP	International <i>Streptomyces</i> project
GN	Gélose nutritive
HPLC	High performance liquid chromatography
MA	Mycélium aérien
MRSA	Staphylococcus aureus résistante à la méthicilline
MS	Mycélium du substrat
PCR	Réaction de polymérase en chaîne

## Résumé

La biodiversité et la recherches de nouvelles espèces d'actinobacteries en milieu marin ainsi que leur potentiel antagoniste ont été étudiés dans 6 échantillons provenant de 3 différentes cotes de l'Algérie: Cherchelle, Gouraya et Tipaza. Au totale, 19 souches d'actinobacteries marines ont été isolés en utilisant le milieu chitine-vitamines agar (Ch-V) additionné des agents sélectifs: un antifongique (Actidione 50 mg L<sup>-1</sup>) et certain antibiotiques (Acide nalidixique 10 mg L<sup>-1</sup> et pénicilline 25 mg L<sup>-1</sup>). Tout le prélèvement analysé contient des actinobactéries et tous les milieux testés ont permis l'isolement d'un nombre variable de souches.

La taxonomie et la diversité de la population d'actinobacteries isolées ont été évaluées en se basant sur des études morphologiques. Les résultats ont montré une certaine diversité dans la communauté des actinobacteries au niveau des prélèvements côtière étudiés. Les souches ont été affiliées à quatre genres fréquents à peu fréquents: *Streptomyce* (68, 42% du totale), *Nocardiopsis/Saccharothrix* (26, 32%) et *Rhodococcus* (5, 26 %).

Le pouvoir antagoniste des 19 souches isolées a été évalué contre plusieurs germes-cibles sur le milieu ISP 2 solide par la méthode des cylindres d'agar. 16 se sont montrées actives contre au moins un germe-cible. En revanche, 3 souches n'ont présenté aucune activité. L'activité antimicrobienne est estimée à 100% chez les *Nocardiopsis/Saccharothrix* suivis de 84,6% chez *Streptomyces*. Cependant, l'unique isolat de *Rhodococcus* (TB1) n'a montré aucune activité. Cette étude a révélée qu'une souche (TA4) possède une forte activité contre deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* 639c résistante à la méticilline et *Bacillus subtilis* ATCC 6633) sur le milieu ISP 2 et moins importante sur 20 autres milieux synthétiques contenant des sources de carbones divers. Une approche polyphasique: morphologique, physiologique et moléculaire (séquençage de du gene codant pour l'ARNr 16S) avec une étude phylogénétique approfondie) lui a été consacrée, cette dernière a rapproché cette souche des espèces de *Streptomyces olivaceus* et *S. pactum* avec un pourcentage de similarité égale à 99,79 %.

La production d'antibiotiques de la souche TA4 a été effectuée dans le milieu ISP 2 liquide pendant 10 jours. La cinétique de la production de des molécules bioactives est suivie quotidiennement contre *Staphylococcus aureus* 639c résistante à la méticilline par la méthode de diffusion des puits, elle a montré que l'incubation pendant 5 jours donne une meilleure activité. Ce résultat a été confirmé par une deuxième cinétique par la méthode de diffusion de disque de papiers imbibés par les extraits à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane. La deuxième cinétique montre aussi que la plus grande activité antibactérienne a été obtenue avec l'extrait à l'acétate d'éthyle. L'analyse par HPLC de cet extrait montre la présence de deux composés hydrophobes et le spectre UV-visible montre qu'ils sont de nature aromatique ou hétérocyclique.

**Mot clés:** Biotope marin, actinobacteries, taxonomie, *Streptomyces*, activité antibactérienne.

## Abstract

The biodiversity and the search for new species of actinobacteria in marine environment and thus their antagonistic potential was studied in 6 samples collected from 3 different shores of Algeria: Cherchelle (Tizirine), Gouraya (bois sacré) et Tipaza (port de Tipaza). In total, 19 marine actinobacterial strains were isolated using chitin -vitamin agar (Ch -V) medium supplemented with selective agents: an antifungal (actidione 50 mg L<sup>-1</sup>) and certain antibiotics (Nalidixic acid 10 mg L<sup>-1</sup> and penicillin 25 mg L<sup>-1</sup>). All the analyzed sample contain actinobacteria and all the tested media permitted the isolation of a variable number of strains.

The taxonomy and the biodiversity of the isolated population of actinobacteria were evaluated based on some morphological studies. The results showed a certain diversity in the actinobacterial community in the studied coastal samples. The strains were identified in four common to slightly frequent genera: *Streptomyces* (68,42% du totale), *Nocardiopsis/Saccharothrix* (26, 32%) et *Rhodococcus* (5, 26 %).

The antagonistic potential of 19 strains was evaluated against several target microorganisms on a semi-solid ISP2 medium by agar-cylinder plate method. 16 were active against at least one target microorganism. In contrast, 3 strains showed no activity. The antimicrobial activity is estimated at 100 % in *Nocardiopsis/Saccharothrix* followed by 84.6% in *Streptomyces*. However, the single isolate of *Rhodococcus*(TB1) showed no activity. This study revealed that a strain (TA4) has a high activity against two Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* resistant to methicillin 639c and *Bacillus subtilis* ATCC 6633) on the ISP2 medium and a less important one on 20 other synthetic media containing various carbon sources. A polyphasic approach: morphological, physiological and molecular (sequencing of the gene coding for ribosomal 16S RNA with a detailed phylogenetic study) was dedicated to it, the latter has approximated this strain to the species *Streptomyces olivaceus* and *Streptomyces pactum* with a percentage similarity of 99.79 %.

Antibiotic production of strain TA4 was carried out in liquid ISP2 medium for 10 days. The kinetic of the production of bioactive molecules was surveyed daily against *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin 639c by agar diffusion method; it showed that incubation for 5 days gives a better activity. This result was confirmed by a second kinetic by paper disk diffusion method soaked by ethyl acetate and dichloromethane extracts. The second kinetic also shows that the greatest antibacterial activity was obtained with the ethyl acetate extract. HPLC analysis of this extract shows the presence of two hydrophobic compounds and the UV-visible spectrum shows that they are aromatic or heterocyclic in nature.

**Keywords:** marine biotope, actinobacteria, taxonomy, *Streptomyces*, antibacterial activity



## ملخص

تم من خلال هذا العمل دراسة التنوع البيولوجي والبحث عن أنواع أصيلة من الأكتينوبكتيريا في وسط بحري وكذا قدرتها التضادية من خلال تحليل 6 عينات من 3 شواطئ جزائرية: شرشال، فورايا وتيبازة .

قمنا بعزل 19 سلالة من الأكتينوبكتيريا البحرية باستعمال الوسط كتين-فيتامين-أغار مضاف إليه عوامل انتقائية: مضاد للفطريات (الأكتيديون 50 ملغ/ل) وكذا بعض المضادات الحيوية ( حمض الناليدكسيك 10ملغ/ل و البنسيلين 25 ملغ/ل). كل العينات التي خضعت للتحليل كانت تحتوي على الأكتينوبكتيريا مما سمح بعزل عدد متغير من السلالات من كل وسط خضع للاختبار.

الدراسة التصنيفية وكذا تنوع عشيرة الأكتينوبكتيريا المعزولة تم بالإعتماد على الدراسة المورفولوجية. أثبتت النتائج بعض التنوع في مجتمع الأكتينوبكتيريا على مستوى العينات المدروسة. نسبت السلالات المعزولة إلى أربعة أجناس شائعة إلى قليلة الانتشار: *Streptomyce* (38,42 % من المجموع) و *Nocardiosis/ Saccharothrix* (26,32 %) و *Rhodococcus* (5,26%).

تمت دراسة القدرة التضادية للسلالات الـ19 المعزولة ضد عدة جراثيم مستهدفة على الوسط صلب 2 ISP بطريقة أسطوانات الأغار. أثبتت 16 سلالة فعاليتها ضد جراثيم مستهدف واحد على الأقل. وعلى العكس من ذلك، 3 سلالات لم تبد أي نشاط مضاد للميكروبات.

قدر النشاط المضاد للميكروبات بـ 100 % عند *Nocardiosis/ Saccharothrix* و 84,6 % عند *Streptomyces* بينما العزلة الوحيدة المنتمية إلى الجنس *Rhodococcus* (TB1) لم تيد أي فعالية. أثبتت هذه الدراسة أن السلالة (TA4) تملك فعالية قوية ضد اثنين من البكتيريا ذات غرام موجب (*Staphylococcus aureus* 639c المقاومة للميتيسلين و *Bacillus subtilis* ATCC 6633) وهذا على الوسط 2 ISP وأقل أهمية على 20 وسطا اصطناعيا محتوية على مصادر كربون مختلفة. تم تخصيص هذه السلالة بدراسة تصنيفية متعددة المراحل: مورفولوجية وفيزيولوجية وجزئية (تحديد تسلسل النكليوتيدات للمورثة المشفرة لـ ARN الريبوزومي 16S ودراسة معمقة للانتساب الوراثي). مما أثبت أن هذه السلالة قريبة من النوعين *Streptomyces olivaceus* و *Streptomyces pactum* بنسبة تماثل وراثي قدرت بـ 99,79%.

تم تحقيق إنتاج المضادات الحيوية من طرف السلالة TA4 في الوسط 2 ISP السائل لمدة 10 أيام حيث تم تتبع حركية إنتاج الجزيئات الفعالة يوميا وهذا ضد *Staphylococcus aureus* 639c المقاومة للميتيسلين باستعمال تقنية diffusion des puits مما أثبت أن الإنتاج الأمثل للجزيئات الفعالة يكون بعد خمسة أيام من التحضين. أكدت هذه النتائج من خلال حركية ثانية بطريقة diffusion de disque de papiers المشبعة بمستخلص الـ acétate d'éthyle والـ dichlorométhane. أثبتت هذه الحركية أيضا أن أكبر نشاط مضاد للبكتيريا يكون بواسطة مستخلص الـ acétate d'éthyle.

أوضحت نتائج التحليل بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة فائقة التحلية وجود مركبين كارهين للماء أما الفحص الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية والمرئية فأثبت أن هذين المركبين من طبيعة عطرية أو متغاير الحلقات.

**الكلمات المفتاحية:** وسط بحري ، أكتينوبكتيريا، تصنيف، *Streptomyces*، نشاط مضاد للبكتيريا.

### Introduction

Les actinobactéries sont très recherchées en biotechnologie à cause de leur rôle important dans la production des composés bioactifs. Ce groupe de bactéries a fourni un nombre considérable d'enzymes utilisées dans les industries, de composés antitumoraux, d'agents immunosuppresseurs, d'insecticides, d'antiparasites, d'herbicides, d'antioxydants et surtout d'antibiotiques (Solanki *et al.*, 2008), et continue toujours à être une source précieuse de ces molécules dont un nombre appréciable a trouvé une application thérapeutique et pharmaceutique.

Leur diversité de colonisation, leur adaptation, leurs résistances à certaines conditions hostiles ainsi que leur importance dans divers secteurs font que ces microorganismes (bactéries) sont l'objet de nombreuses études (Loucif, 2006)

L'actinobactériologie marine est devenue récemment l'un des principaux domaines de recherche émergents dans le monde entier (Sivakumar *et al.*, 2007). Les actinobactéries marines se produisent sur les sédiments et dans l'eau et également sur d'autres biomasses et substrats. Cependant, il n'a pas encore été résolu si ces micro-organismes font partie de la communauté autochtone microbienne marine, originaire de terre comme habitat ou ils sont simplement portés à la mer sous forme de spores résistantes (Larpen et Sanglier, 1989; Goodfellow et Haynes, 1984; Bull *et al.*, 2000). Leur avantage sont assurés par la diversité de biotope marin qui a exercé une force motrice sur la sélection des bactéries menant à des nouvelles stratégies d'adaptation et à la synthèse de nouveaux bio-métabolites actifs (Jensen et Fenical 1996; De Carvalho et Pedro 2010).

La recherche sur la biodiversité des actinobactéries marine est non seulement importante pour leur exploitation (composés bioactifs commercialisés, agents anti-tumoraux et enzymes d'intérêt industriel), mais également nécessaire pour les études de base (taxonomie et perspectives écologiques) (Takizawa *et al.*, 1993; Mincer *et al.*, 2002; Stach *et al.*, 2003)

Le choix de biotope marin comme foyer de recherche est basé sur les résultats intéressants obtenus par plusieurs chercheurs, ces travaux ont montré la richesse et la diversité de ce biotope en actinobactéries, qui parfois dépassent les autres groupes de microorganismes en densité (Walker and Colwell, 1975; Barcina *et al.*, 1987; Goodfellow and Haynes, 1984; Helmke and Weyland, 1984; Pisano *et al.*, 1986, 1989; Jensen *et al.*, 1991). Peu d'études ont été dirigées spécifiquement au actinobactéries marines, mais les preuves disponibles confirment une grande diversité taxonomique et distributions à travers les habitats marins (Weyland, 1969; Goodfellow et Haynes, 1984; Colquhoun *et al.*, 1998a; Takizawa *et al.*, 1993). En outre, le temps de changements dans la composition de la

population microbienne peut également se produire, souvent très rapidement et peut être induite par le biotope et/ou conduit par des forces extérieures (Bull, 2004). Une telle variabilité temporelle a également été décrite par Barcina *et al.* (1987), Zheng *et al.* (2000) et Jensen *et al.* (2005). Récemment, il ya eu une augmentation de données sur l'isolement des actinobacteries à partir de milieu marin dans la littérature notons ceux de Paul *et al* (2005), Yingjian *et al* (2009), Luis *et al* (2004), Harald *et al* (2007), mais il n'y a pas assez de travaux effectués sur l'isolement, l'identification des actinobactéries marins en Algérie à l'exception des recherches réalisées par Boucheffa (2011) et Djinni (2014). L'ensemble de ces travaux ont suggéré que ces habitats peuvent être utiles pour l'isolement d'un nombre indéfini d'actinobactéries à potentiel important pour la production de nouveaux produits utiles.

Dans ce contexte nous avons choisi six sites dans trois régions en Algérie pour isoler des actinobactéries, déterminer le pouvoir antagoniste des souches isolées et pour sélectionner une souche afin d'étudier ses antibiotiques.

Ce travail est présenté en trois parties:

La première partie est réservée à une revue bibliographique portant sur les actinobacteries en général et les actinobacteries marines en particulier. Nous avons présenté leur écologie, leur importance et leur taxonomie, ainsi que leur pouvoir antagoniste en se focalisant sur les antibiotiques.

La deuxième partie est relative à la description du matériel et des méthodes utilisés.

Dans la troisième partie, les résultats sont présentés et discutés. Ils concernent l'isolement des actinobacteries marins et l'étude taxonomique des souches obtenues à travers des études morphologiques. Une étude taxonomique approfondie (morphologique, physiologiques et moléculaire) a concerné une nouvelle souche. Les souches ont également fait l'objet d'une étude de leur pouvoir antagoniste par la mise en évidence de leur activité antibiotique contre des germes-cibles. Les antibiotiques de la souche la plus intéressante du point de vue activité et originalité ont été caractérisés partiellement.

## I. DÉFINITION DES ACTINOBACTERIES

Les actinobactéries ont souvent été confondues avec les champignons du fait de leur morphologie filamenteuse (présence de filaments ramifiés, sporulation) (Reponen *et al.*, 1998), ainsi que de l'allure mycosique des maladies que certains provoquent (Gazenko *et al.*, 1998). Toutefois, leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques les rangent sans ambiguïté parmi les procaryotes (Becker *et al.*, 1965; Lechevalier et Lechevalier, 1981). Ainsi, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais du peptidoglycane, et leur cytologie est celle des bactéries. Ces caractères s'ajoutent à d'autres comme la sensibilité à des macrophages et à des antibactériens, qui confirment le bien-fondé de la classification définitive des actinobactéries parmi les bactéries (Larrent, 1989; Mariat et Sebald, 1990)

Les différentes éditions du Manuel de Bergey ont apporté des définitions actualisées des actinobactéries avec des données fournies par des travaux récents par rapport à l'époque de chaque édition. Dans l'édition de 2012 de ce manuel, la classe des *Actinobacteria* est définie comme regroupant des bactéries à Gram positif ayant un taux élevé en guanine + cytosine (GC%): supérieur à 55%, haut coefficient de Chargaff généralement compris entre 60 et 75%, la plupart étant mycélienne et qui forme un groupe homogène sur la base des données de la biologie moléculaire (séquençage de l'ADN ribosomique 16S, hybridation ADN-ADN).

## II. HISTORIQUE DES ACTINOBACTERIES

L'histoire des actinobactéries peut être divisée en 4 grandes périodes:

**1. La première période (1877-1890):** a été nommée « période médicale » du fait que l'intérêt porté à ces microorganismes était dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuait (Baldacci, 1962).

**2. La seconde période (1900-1940):** se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinobactéries du sol, avec les travaux de Waksman (1919), Lieske (1921) et Krassinikov (1938). Elle couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinobactéries et les premières tentatives pour distinguer deux groupes: les pathogènes et les saprophytes (Mariat et Sebald, 1990)

**3. La troisième période (à partir de 1940):** est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinobactéries. Le nom de Waksman lui est indiscutablement lié avec la découverte, en 1944, de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (Le minor, 1989; Sanglier et Trujillo, 1997). Elle peut être définie encore comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinobactéries, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries et de leur intérêt pour la production de métabolites

secondaires et leur potentialité de biodégradation des composés organiques. Cette période est caractérisée par un accroissement brusque du nombre d'espèces décrites (Baldacci, 1962).

**4. La quatrième période (depuis 1960):** l'essor des méthodes de génétique, initiées par Hopwood (Hopwood, 1973; Chater, 1999). Puis de génomique (Hopwood, 2003), a révolutionné la classification des espèces (Ventura, 2007). Enfin les méthodes de découverte de métabolites secondaires et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes (Donadio, 2002).

### III. ECOLOGIE ET DISTRIBUTION DANS LA NATURE

#### 1. Ecologie des actinobactéries

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants, et en particulier le sol (Waksman, 1959; Porter, 1971; Lacey, 1973; Williams *et al.*, 1984). Ils constituent une part importante de la microflore tellurique: 10 à 20% ou parfois plus (Dommergues et Mangenot, 1970; Ishizawa et Araragi, 1976).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95% du total des actinobactéries (Lacey, 1973; Elwan *et al.*, 1985). Après *Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora* (Dommergues et Mangenot, 1970). Les autres genres ne constituent qu'une fraction minime et sont parfois peu fréquents ou même assez rares.

La plupart des actinobactéries sont saprophytes mais quelques une peuvent être pathogènes ou symbiotes des plantes et des animaux (Suzuki *et al.*, 1994). En générale, les actinobactéries sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont aussi chimio-autotrophe (Ensign *et al.*, 1993).

Physiologiquement, il est possible de distinguer les formes aérobies qui sont de très loin les plus nombreuses, et des types anaérobies trouvés primitivement chez les animaux et l'homme. Les actinobactéries préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant les 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

#### 2. Distribution dans la nature

Les actinobactéries sont largement répandus dans le monde. Leur nombre dépend de nombreux facteurs, dont la nature et l'abondance de la matière organique, la profondeur, le pH, l'aération et l'humidité (Theilleux, 1993).

## 2.1. Le sol

Le réservoir le plus riche, réservoir à partir duquel ces microorganismes peuvent envahir de nombreux biotopes. De nombreuses actinobactéries sont saprophytes et participent à la fertilisation des terres agricoles, à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons (Holzapfel *et al.*, 2002; Natalia et Manucharova *et al.*, 2006). Les actinobactéries du sol sont surtout présents en surface, entre 0 et 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols (Omura, 1992; Zaitlin *et al.*, 2003; Zaitlin et Watson, 2006). Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %, le rapport microorganisme totaux/ actinobactéries, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente (Waksman, 1967).

Les actinobactéries sont retrouvées dans les sols polaires gelés en permanence tout comme dans des sols désertiques chauds et secs, les sols hautement contaminés par des métaux lourds, les sols pollués par les hydrocarbures et les grottes naturelles (Moncheva *et al.*, 2002).

## 2.2. Le milieu marin

Les actinobactéries ont été également isolées à partir de nombreux environnements aquatiques: eau de mer et de sédiments marins (Jensen *et al.*, 1991; Ghanem *et al.*, 2000). Certaines souches ont été retrouvées dans des environnements marins (Imada *et al.*, 2007) dans des sédiments situés à plus de 4000 m de profondeur, même à partir d'eau douce (Kitouni *et al.*, 2005). D'autres souches sont présentes dans les fonds fluviaux ou lacustres et même à partir d'eau issue de marécages salés et les lacs extrêmement alcalins (Al-Zarban *et al.*, 2002; Boughachiche *et al.*, 2005).

La colonisation normale du milieu marin est un point controversé. Selon les uns, il existerait une flore d'actinobactéries spécifique aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible. Selon d'autres, les actinobactéries isolés de ces milieux correspondraient à des souches terricoles adaptées à la salinité marine (Larpent et Sanglier, 1989).

## 2.3. La faune et l'homme

En pathologie humaine, plusieurs genres sont responsables d'infections ou d'actinomycoses. Certaines espèces du genre *Actinomyces* semblent avoir un rôle dans le développement des caries dentaires (Sarkonen *et al.*, 2000). Parmi les actinobactéries aérobies pathogènes, le genre *Nocardia* revêt une importance médicale particulière et comprend aussi, plusieurs espèces responsables de pathologies chez les animaux et chez l'Homme à l'exemple de *Nocardia asteroides*, responsable de la nocardiose humaine (Zhang *et al.*, 2003). D'autres espèces tels que *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, agents de la tuberculose et de la lèpre. Malgré le nombre important d'espèces

de *Streptomyces*, seulement trois d'entre elles sont habituellement citées en pathologie humaine: *S. paraguayensis*, *S. griseus* et *S. somaliensis* (Borelli et Middelveen, 1986). La place de pathogène opportuniste des *Streptomyces* tend à se préciser devant le nombre croissant d'infections systémiques rapportées dans la littérature (péritonite, péricardite chronique, septicémie, abcès du cerveau, endocardite, surinfection de plaie et pneumonie) (Aouar, 2006).

#### 2.4. La flore

Certains actinobactéries sont des symbiotes de plantes (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985). Le genre *Frankia* vit en association avec de nombreux arbres tels que Casuarina et forme des nodules racinaires où l'azote gazeux est fixé (Lechevalier, 1981). Cette bactérie fixatrice d'azote (capable d'utiliser l'azote atmosphérique comme seule source d'azote) forme des nodules au niveau des racines des angiospermes, et confère donc un avantage à la plante pour croître en sol pauvre en azote.

Plusieurs souches et espèces d'actinobactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Microbispora*, etc., ont été décrites comme endophytes et ayant un effet PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) et certaines sécrètent des phytohormones comme l'acide 3-indol-acétique (AIA) et la gibbérelline (Solans *et al.*, 2011).

Des exemples d'espèces endophytiques et phytopathogènes ont été répertoriées, les exemples les plus étudiés sont *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies* et *Streptomyces turgiscabies*, responsables de la gale de la pomme de terre (Lindholm, 1997; Coombs et Franco, 2003)

## IV. IMPORTANCE DES ACTINOBACTERIES MARINES

Si quelques espèces d'actinobactéries sont pathogènes, la majorité est cependant très utile. Leur hétérogénéité métabolique et leur diversité écologique assez exceptionnelles font d'eux des producteurs potentiels de nombreuses molécules à propriétés très diverses et intéressantes dans plusieurs domaines (médical, vétérinaire, et industriel) (Peczynska-Czoch et Mordarski, 1988; Sanglier *et al.*, 1993).

### 1. Rôle des actinobactéries dans le milieu marin

Les actinobactéries ont un rôle important dans l'environnement marin. La dégradation et la transformation de divers matériaux dans cet environnement est un processus continu par l'action d'une variété des microorganismes incluant les actinobactéries. Il y a une discussion que l'augmentation ou la diminution des enzymes particulière produite par ces microorganismes peut indiquer la concentration du substrat naturel et les conditions de l'environnement (Das, 2006).

Les actinobactéries sont également signalés pour contribuer à la décomposition et le recyclage des composés organiques (Weyland, 1969) et même à la dégradation des polymères complexes (polysaccharides, chitine, lignocelluloses), des mycotoxines et de bien d'autres substrats.

## 2. Antibiotiques et autres molécules bioactives

Les actinobactéries sont des producteurs de nombreux composés bioactifs. Cependant, ils sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques (Räty *et al.*, 2002; Takahashi et Omura, 2003; Solanki et al 2008). Ces molécules bioactives, sont réputés pour des utilisations thérapeutiques (thérapie humaine et vétérinaire), industrielles et commerciales (l'industrie pharmaceutique) (Solanki *et al.*, 2008).

### 2.1. Les antibiotiques

Les actinobactéries marines constituent une importante source de nouveaux composés bioactifs (Colwell et Hill, 1992) car les conditions environnementales de la mer sont extrêmement différentes des conditions terrestres, ils produisent différents types des antibiotiques dont plusieurs ont été isolés par de nombreux chercheurs, polyketide contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (Sujatha *et al.*, 2005), Bioxalomycins (Bernan *et al.*, 1994), pluramycin (Biabani *et al.*, 1997), Parimycin (Maskey *et al.*, 2002), Himalomycin A et B, fridamycin (Maskey *et al.*, 2003), Diazepinomicin (Charan *et al.*, 2004), Chinikomycins A and B (Li *et al.*., 2005), Sporolides A et B (macrolides) (Buchanan *et al.*., 2005). Ces molécules sont entièrement nouvelles et uniques par rapport à celles qui sont produites par des actinobactéries provenant de milieu terrestre (Meiying et Zhicheng, 1998)

Depuis la découverte de l'actinomycine, de nombreuses études ont été réalisées, plusieurs genres ont été découverts mais le genre *Streptomyces* d'origine marine a été plus fréquemment enregistré, approximativement, plus de deux tiers des milliers d'antibiotiques et autres molécules bioactives naturels ont été isolés principalement par ce genre (Omura, 1992)

Les dernières recherches ont basés sur l'étude et l'exploitation des actinobactéries rares tels qu'*Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Planobispora*, *Streptosporangium* et *Planomonospora* car ces derniers ont prouvé leurs potentiels de production de nouveaux antibiotiques. (Lazzarini *et al.*, 2000).

### 2.2. Les mélanines

Les mélanines ou mélanoïdes sont des pigments sombres, naturels et complexes, largement présents chez les animaux et les plantes. Divers microorganismes y compris les actinobactéries

marines synthétisent et excrètent les mélanines qui sont considérés comme des critères utiles pour leurs études taxonomiques (Zonova, 1965; Arai et Mikami, 1972).

Ils ont plusieurs fonctions biologiques, y compris photoprotection, thermorégulation, protection contre les radicaux libres, des chélateurs de cations, et des antibiotiques, ils ont des propriétés antioxydantes et radio protectrices qui peuvent protéger efficacement les organismes du rayonnement ultraviolet pour cela ils sont fréquemment utilisés en médecine, pharmacologie et préparations cosmétiques (Dastager, 2006).

La fonction des mélanines dans les microorganismes est supposée être associée avec la protection contre les stress environnementaux. Par exemple, les bactéries produisant les mélanines sont plus résistantes aux antibiotiques (Butler et Day, 1998; Lin et al, 2005)

### **2.3. Les enzymes**

Les actinobactéries marines sont capables de catalyser diverses bio-réactions chimiques (Das, 2006). Différentes enzymes commerciales ont également été obtenues à partir de ces microorganismes: L-glutaminase (Sivakumar *et al.*, 2006),  $\alpha$  galactosidase (Anisha et Prema, 2006; Kundu *et al.*, 2006) amylase, la cellulase (Murugan *et al.*, 2007; Sahu *et al.*, 2007), protéase et la L-asparaginase (Sahu *et al.*, 2007a; Sahu *et al.*, 2007b).

### **2.4. Les composés anticancéreux**

Divers groupes d'actinobactéries marines sont connues pour la production de différents composés anticancéreux. Plusieurs types de composés cytotoxiques ont été signalés et produits par des actinobactéries marines: Lorneamides A et B (Capon *et al.*, 2000), trioxacarcins (Maskey *et al.*, 2004), caprolactones (Stritzke *et al.*, 2004), glycosylmannosyl-glycerolipide (Lang *et al.*, 2004), metacycloprodigiosine et undecyprodigiosine (Liu *et al.*, 2005), Lajollamycin, nitro-tetraene spiro-beta-lactone-gamma-lactam (Manam *et al.*, 2005), terpenoid chloro-dihydroquinones (Soria-Mercado *et al.*, 2005), Streptokordine (Jeong *et al.*, 2006). Les composés isolés ont montré une activité de significative contre différentes lignées de cellules cancéreuses.

### **2.5. Protéines cellulaires uniques**

Les actinobactéries sont connus pour produire des métabolites secondaires qui améliorent la croissance. Certains de ces métabolites sont des composés organométalliques tels que ferrioxamines, mag-nesidine et bléomycine, contenant du bore tel que boromycine et bléomycine (Nakamura *et al.*, 1997) et acides aminés inhabituels tel que l'alanosine, l' amino dichlobutyrique, l'azaleucine, 4-oxalysine etc. (Prave *et al.*, 1987).

## V. LES ANTIBIOTIQUES

Lors de la découverte des antibiotiques, le mot antibiotique (du grec anti: « contre », et bios: « la vie ») désigne une substance naturelle, un produit du métabolisme bactérien ou fongique, qui a une action d'inhibition ou de destruction spécifique contre les bactéries (Smaoui, 2010). Actuellement, cette définition s'est encore élargie pour devenir: toute substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui a le pouvoir d'inhiber ou détruire des microorganismes (bactéries et champignons) et également d'avoir des actions anti-inflammatoires, anti-suppresseurs et anti-tumorales (Smaoui, 2010).

Les actinobactéries occupent la première place comme fournisseurs de substances bioactives principalement le genre *Streptomyces* qui produit lui seul plus de 80% de ces substances, (Berdy, 2005; Solecka *et al.*, 2012), grâce à leur diversité écologique, leur hétérogénéité biochimique et leur capacité exceptionnelle à produire des métabolites secondaires, les actinobactéries sont considérées comme des candidats idéaux pour la recherche de divers composés intéressants dans plusieurs domaines (industrie pharmaceutique, alimentaire et autres) (Toumatia, 2015).

### 1. Classification générale des antibiotiques

Près de 7000 molécules ont été classées par Berdy *et al.* (1987) et Berdy (2005), puis par plusieurs autres auteurs dans des travaux récents publiés sous forme d'articles. Ainsi, toutes ces molécules ont été regroupées dans neuf grandes familles et plusieurs sous-familles. Par ailleurs, il est à noter que ce type de classification est basé uniquement sur la structure chimique des molécules qu'elle est la plus utilisée en recherche fondamentale mettant à l'écart tout intérêt thérapeutique et clinique (Tableau 1) (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988).

C'est pour cela que d'autres types de classifications utilisées dans le domaine médical existent, ceci se fait pour un intérêt pratique entre autre dans le domaine médical où la classification chimique importe peu. Les composés bioactifs peuvent être classés en fonction de leur spectre d'action, de leur type d'action, de leur mode d'action, de leur origine ou encore de leur charge électrique.

**Tableau 1:** Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy *et al.*, 1987).

Familles d'antibiotiques		Sous-familles	Exemples
01	Glucides apparentés et	Glucides pures	Nojirimycine
		Aminoglycosides	Streptomycine, gentamicine, kanamycine.
		Glycosides	C-glycosides : vancomycine . N-glycosides : streptothricine.
		Glycolipides	Mocnomycine.
02	Lactones macrocycliques	Macrolides	Spiramycine, érythromycine
		Polyènes	Amphotéricine, nystatine, candidine.
		Macrotétrolides	Tétranactine, nonactine.
		Macrolactames	Rifamycine .
03	Quinones Appaentés et	Polycycliques accolés linéairement	Tétracyclines
		Dérivés naphtoquinoniques	Anthracyclines
		Dérivés benzoquinoniques	Mitomycine
04	Acides aminés et peptides	Dérivés d'acides aminés	Cyclosérine, pénicillines, nocardicine.
		Homopeptides	Bacitracine, cyclosporine.
		Hétéropeptides	Aculéacine
		Peptolides	Valinomycine
05	Hétérocycles azotes à	Hétérocycles nom accolés	Caerulomycine, mildiomycine.
		Hétérocycles accolés	Phénazines, herbicine.
06	Hétérocycle oxygène à	Polyéthers	Monensine, nigéricine.
07	Composés alicycliques	Dérivés du cycloalcane	Cycloheximide.
		Terpènes	Acide marasmique.
		Oligoterpènes	Acide fusidique.
08	Aromatiques	Dérivés benzéniques	Chloramphénicol.
		Aromatiques accolés	Griséofulvine .
		Composés nom benzéniques	Fusariocine .
		Autres dérivés aromatiques	Novobiocine .
09	Aliphatiques	Dérivés des alcanes	Elaiomycine .
		Dérivés d'acides carboxyliques	Céruleine
		Composés contenant du phosphore ou du soufre	Fosfomycine

## 2. Recherche de nouveaux antibiotiques et autres molécules bioactives

### 2.1. Méthodes de criblage conventionnelles

Les programmes classiques de screening des antibiotiques impliquent l'isolement et la culture du microorganisme, l'évaluation de son activité antibiotique, la caractérisation et l'identification des molécules actives (Goodfellow *et al.*, 1988).

### 2.1.1. Isolement des actinobacteries et conditions de culture

L'isolement des actinobacteries producteurs d'antibiotiques repose non seulement sur la recherche des *Streptomyces* (genre le plus fréquemment étudié) mais aussi sur la recherche des actinobacteries rares autres que ce genre (*Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis* etc.).

L'obtention de ces derniers est possible grâce à l'isolement sélectif, par l'addition d'agents chimiques dans les milieux d'isolement tels que, les antibiotiques et la recherche des actinobacteries dans des habitats inhabituels (Nolan et Cross, 1988; Sabaou *et al.*, 1998).

La variation de la composition des milieux de production des antibiotiques est un élément clé pour l'obtention des molécules actives. Plusieurs travaux ont signalé l'effet des sources de carbone et d'azote sur la biosynthèse des antibiotiques (Demain *et al.*, 1979; Bouras, 2005), ainsi que les besoins en sels minéraux (Hermans *et al.*, 1989). Certains composés favorisent la production d'un type d'antibiotique comme l'amidon et la farine de soja qui incitent la production des antibiotiques aminoglycosidiques. Les conditions de culture comme la température et l'agitation jouent aussi un rôle important dans la production des antibiotiques (Okami et Hotta, 1988).

### 2.1.2. Choix des microorganismes-cibles

La mise en évidence de l'activité antibiotique d'une actinobacteries est réalisée sur des milieux de culture solides par les méthodes des stries croisées, des cylindres d'agar ou de la double couche, contre une série de microorganismes-cibles (champignons, bactéries et levures). Certains chercheurs ont développé des screening ciblés par l'utilisation des bactéries résistantes à certains types d'antibiotiques (Okami et Hotta, 1988).

### 2.1.3. Production et caractérisation des antibiotiques

La production d'antibiotiques est réalisée dans les conditions optimales de production en milieu de culture, température et durée d'incubation, pH et aération. Les molécules actives produites par les actinobacteries sont récupérées par extraction à partir de la biomasse ou plus souvent du filtrat de culture, en utilisant des solvants qui permettent une bonne extraction sans altération des métabolites.

Les métabolites obtenus sont séparés par différentes méthodes de purification telles que, la chromatographie sur couche mince, la chromatographie d'exclusion sur gel (séphadex, polyacrylamide ou agarose etc.) et l'HPLC comme dernière étape de purification.

La caractérisation des antibiotiques purifiés repose sur les différentes analyses spectroscopiques: UV-visible, infrarouge, masse et résonance magnétique nucléaire (RMN).

## 2.2. Méthodes de criblage actuelles

Actuellement, l'évaluation de l'activité antibiotique des actinobactéries a évolué de points de vue techniques et moyens utilisés. Ces techniques s'ajoutent aux techniques anciennes qui sont toujours utilisées pour la mise en évidence de l'activité antibiotique.

### 2.2.1. Screening du potentiel génétique de production des métabolites secondaires

L'étude des actinobactéries a permis la mise en évidence d'une partie limitée de leur potentiel à produire des molécules bioactives, qui est estimé à 3% chez le genre le plus étudié, *Streptomyces*. De ce fait, des méthodes de criblage génétique sont développées pour révéler leur capacité réelle à produire des molécules bioactives et par conséquent la découverte de nouvelles molécules (Gontang *et al.*, 2010).

La mise en évidence des gènes à étudier est réalisée par l'amplification par PCR de l'ADN matrice, obtenu après extraction à partir des actinobactéries, en utilisant des couples d'amorces spécifiques (Metsä-Keletä *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003; Ayuso-Sacido et Genilloud, 2005). Les séquences obtenues sont comparées avec les séquences présentes dans les banques de données par la réalisation du Blast. Cette comparaison peut indiquer le potentiel des actinobactéries à produire un ou plusieurs types de molécules.

### 2.2.2. Miniaturisation de fermentation

Un système de fermentation de petits volumes de culture a été développé pour la première fois par Duetz et Witholt (2001), par l'adaptation des "plaques microlitres" (MTP) de 24 puits de capacité de 2 à 4 ml par puits, destinées à l'origine aux études sérologique et la maintenance de cultures de clone d'*Escherichia coli*. La croissance des collections de culture hétérogènes dans des plaques de MTP est avantageuse pour des raisons logistiques et également pour permettre des économies importantes en coûts, en mains d'œuvre et en utilisation des équipements au cours des projets de screening à grande échelle (Duetz et Witholt, 2001).

Cette méthode permet d'exploiter les gènes qui sont présents dans le génome des actinobactéries mais non exprimés toute en diversifiant les nutriments afin d'optimiser les besoins nutritionnels et de faire exprimer le potentiel de production des métabolites secondaires par différentes souches (Genilloud *et al.*, 2011).

## VI. TAXONOMIE DES ACTINOBACTERIES

### 1. Position taxonomique des actinobacteries

Selon Bergey (1994), les actinobacteries étaient classés dans le Règne des Procaryotes, la Division des Firmicutes, la Classe des *Thallobacteria* et l'Ordre des *Actinomycetales*. Cet ordre regroupait les bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en guanine plus cytosine (G + C) supérieur à 55% et présentant une grande variabilité morphologique.

La classe des *Thallobacteria* a été remplacée par *Actinobacteria* ((Bergey ,2004).

Dans le manuel de Bergey de 2012, la définition des actinobacteries est restée la même (bactéries à Gram positif ayant un G+C supérieur à 55% et présentant une grande variabilité morphologique, la plupart étant mycéliens). Mais sur la base des données de la biologie moléculaire (notamment le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S), la classification supragénérique des actinobacteries a subi un profond remaniement. Ces microorganismes sont classés actuellement dans le domaine de *Bacteria*, le phylum des *Actinobacteria* qui contient 6 classes, 21 ordres, 53 familles et 221 genres (Manuel de Bergey , 2012).

### 2. Critères d'identification des actinobacteries

#### 2.1. Evolution des critères d'identification

Au cours de cette évolution, quatre périodes distinctes ont marqué la systématique des actinobacteries:

**2.1.1. La première période (s'est étendue jusqu'au début des années 1960):** basée essentiellement sur l'ordre descriptif des caractéristiques macro et micro morphologiques (Pridham *et al.*, 1958). Ces critères ont trouvé leur limite à partir du moment où l'Ordre des *Actinomycetales* a commencé à s'agrandir.

**2.1.2. La seconde période (à partir des années 60):** a vu le développement de la chimiotaxonomie. Ainsi, la composition des parois cellulaires en acides aminés et des cellules entières en sucres ont permis d'apporter plusieurs clarifications notamment chez les deux principaux genres, *Streptomyces* et *Nocardia*, où une grande confusion régnait auparavant (Becker *et al.*, 1964; Lechevalier et Lechevalier, 1970). Il en est de même pour l'analyse des lipides membranaires et pariétaux tels que les acides mycoliques (Mordarska *et al.*, 1972; Minnikin *et al.*, 1977), les phospholipides (Minnikin *et al.*, 1977), les ménaquinones (Collins et Jones, 1981) et les acides gras (Grund et Kroppenstedt, 1990). Ces critères chimiques, combinés aux descriptions morphologiques, se sont révélés être jusqu'à l'heure actuelle, un outil très efficace pour l'identification des genres d'actinobacteries.

**2.1.3. La troisième période (à partir des années 70):** a vu l'avènement de la taxonomie numérique assisté par ordinateur. Le but était de clarifier l'identification des espèces. Le principe consiste à traiter avec un logiciel approprié les résultats de plusieurs dizaines de tests physiologiques et biochimiques, dont chacun a le même poids taxonomique. Le logiciel permet d'obtenir un dendrogramme montrant les pourcentages de similitude entre les espèces dont la position taxonomique a ainsi été clarifiée pour plusieurs d'entre elles (Goodfellow, 1971; Athalye *et al.*, 1985; Goodfellow *et al.*, 1990; Grund et Kroppenstedt, 1990).

**2.1.4. La quatrième période (à partir des années 80):** avec le recours à l'outil moléculaire pour déterminer les parentés phylogénétiques entre les actinobactéries. Pour cela, plusieurs techniques ont été utilisées, telles que l'hybridation ADN-ADN, la détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de guanine + cytosine), le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (Stackebrandt et Woese, 1981). Ces analyses étaient d'un apport considérable dans la reconnaissance des parentés phylogénétiques entre les actinobactéries à l'échelle des espèces, des genres et même des familles (Stackebrandt *et al.*, 1997; Labeda *et al.*, 2001).

## **2.2.1. Critères d'identification des genres**

### **2.2.1.1. Critères morphologiques**

#### **a. Critères macromorphologiques**

Les caractères culturels contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinobactéries entre eux. L'identification macromorphologique repose sur l'observation à l'œil nu de:

- La production d'un mycélium aérien (MA) (de nombreux genres) ou non (*Micromonospora*)
- La couleur du MA et du MS.
- La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

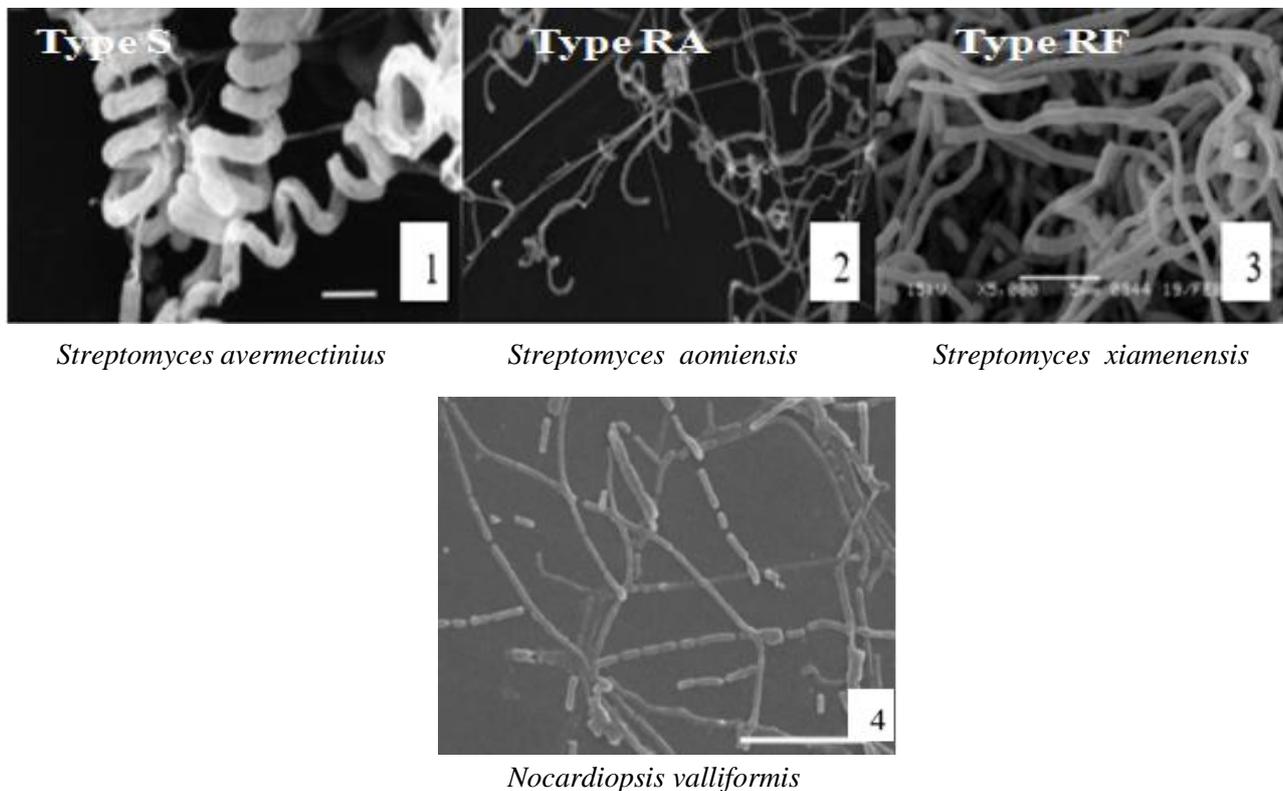
#### **b. Caractères micromorphologiques**

Les caractères micromorphologiques sont déterminés par l'observation directe au microscope optique (et parfois électronique) des cultures poussant sur les milieux gélosés (Tresner *et al.*, 1961) il s'agit de noter:

- La fragmentation ou non du MS
- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur la MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaînes); la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) (figure 1).

-La présence de spores mobiles (*Planomonospora*,) ou non mobiles (*Streptomyces* ainsi que d'autres nombreux genres)

-La présence de structures particulières comme les sporanges, les sclérotés ou synnemata (*Actinosynnema*) (Demain et Solomon, 1986).



**Figure 1.** Micromorphologie de quelques genres d'actinobactéries.

Micrographies selon Takahashi *et al.*, 2002 (1), Nagai *et al.*, 2010 (2), Xu *et al.*, 2009 (3), Yang *et al.*, 2008 (4).  
1: chaînes de spores spiralées; 2: chaînes en crochets ou en boucles; 3: chaînes de spores droites à flexueuses; 4: spores en bâtonnets et espacées formant des chaînes droites.

Mais bien qu'il soit parfois possible de classer une souche sur la base de critères morphologiques tout à fait évident, ceux-ci ne suffisent pas pour établir une détermination correcte et il est indispensable de considérer d'autres critères.

### 2.2.1.2. Critères chimiques: chimio taxonomie

#### a. Les acides aminés

Ils sont présents au niveau de la paroi cellulaire. Deux acides aminés sont taxonomiquement importants, l'acide diaminopimélique (DAP) qui peut être présent sous forme d'isomères LL ou DL (mésos) et la glycine qui est variablement présente (Lechevalier et Lechevalier, 1970a; Larpent et

Sanglier, 1989). Le DAP est remplacé chez les actinobactéries non mycéliens par de la lysine, de l'ornithine ou de l'acide diaminobutyrique (Becker *et al.*, 1965).

## **b. Les sucres**

Ils sont présents dans les cellules entières. Les sucres taxonomiquement importants pour les actinobactéries sont les couples arabinose-galactose, arabinose-xylose, rhamnose-galactose enfin le madurose ou 3-O-méthyl-galactose (Lechevalier et Lechevalier, 1970a; Labeda et Lechevalier, 1989; Stackebrandt *et al.*, 1994).

## **c. Les Lipides**

Les lipides taxonomiquement importants peuvent être représentés par trois groupes: les lipides polaires, les ménaquinones et les acides mycoliques.

### **c.1. Les phospholipides**

La diversité des phospholipides a permis à Lechevalier *et al.* (1977) de distinguer cinq chimiotypes notés de PI à PV (**PI, PII, PIII, PIV, PV**) et caractérisés par la présence généralement d'un ou de deux phospholipides caractéristiques (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine; phospholipides contenant de la glucosamine et phosphatidylglycérol) selon les genres et les espèces (Lechevalier *et al.*, 1977).

### **c.2. Les ménaquinones**

Les ménaquinones des actinobactéries possèdent dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carbonée aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont partiellement saturés et contiennent de huit à dix unités isoprènes (Kroppenstedt, 1985). Deux exceptions, *Gordona aurantiaca* et *Corynebacterium paurometabolum*, contiennent des chaînes isoprényles complètement insaturées (Collins et Jones, 1981)

La variation dans la longueur et le degré de saturation (d'hydrogénation) de la chaîne latérale des ménaquinones leur a donné une importance dans la chimiotaxonomie (Collins, 1985). Sur la base de la présence de certaines ménaquinones, Kroppenstedt (1985) a désigné 11 types.

### **c.3. Les acides mycoliques**

Ce sont des lipides complexes insaturés contenant 20 à 90 atomes de carbone, présents au niveau de la paroi cellulaire de certaines actinobactéries ayant le chimiotype IVA. Ils sont donc utiles pour différencier certains genres de ce type entre eux, par leur présence ou leur absence, ainsi que par

leur structure chimique (Mordarska *et al.*, 1972), comme par exemple *Nocardia* (50 atomes de carbone) et *Corynebacterium* (30 atomes de carbone) (Mordarska *et al.*, 1972).

#### **c.4. Les acides gras**

Ils sont présents au niveau de la membrane cellulaire. Ces molécules sont des chaînes comportent 12 à 20 atomes de carbone et peuvent être saturées ou insaturées, droite ou ramifiées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre (Kroppenstedt *et al.*, 1990; Rainey *et al.*, 1996)

### **2.2.2. Critères d'identification des espèces**

#### **2.2.2.1. Critères physiologiques et taxonomie numérique**

Les tests physiologiques utilisés consistent en des tests de dégradation de différents composés (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.), des tests de résistance aux différents agents physiques (température et pH) et chimiques (chlorure de sodium, phénol, etc.), ainsi qu'à divers antibiotiques. Bien que les tests physiologiques aient été utilisés depuis très longtemps, en même temps que les descriptions morphologiques, leur efficacité réelle n'est apparue que lorsqu'ils ont été exploités en taxonomie numérique.

L'utilisation de la taxonomie numérique par le biais d'outils informatiques de calcul a permis de surmonter les difficultés inhérentes aux interprétations des grands résultats obtenus (ou matrices complexes) et rendre ainsi possible l'utilisation des résultats de ces tests dans des actinobactéries (Goodfellow, 1971). Les taxons étudiés sont comparés entre eux pour déterminer les degrés de ressemblances Sokal et Michener et de Jaccard (Sneath, 1989).

La taxonomie numérique renforce l'identification des espèces, d'autant plus qu'il existe une bonne corrélation entre cette analyse et les résultats des études chimiotaxonomiques et moléculaires (Goodfellow *et al.*, 1990; Grund et Kroppenstedt, 1990; Stackebrandt et Schumann, 2006; Meklat *et al.*, 2012)

#### **2.2.2.2. Critères moléculaires**

La taxonomie actuelle exige les analyses moléculaires. Ces analyses constituent un outil fiable, puissant et obligatoire pour la proposition de nouveaux genres ou de nouvelles espèces. Elles ont permis de corriger la position taxonomique de certains genres et espèces déterminés auparavant sur la base des critères morphologiques, physiologiques et chimiques (Fischer *et al.*, 1983; Ochi *et al.*, 1993).

### a. Détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de guanine+cytosine)

En 1949, Chargaff et ses collaborateurs, montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce. Chez les bactéries, les valeurs du (G+C %) sont très dispersées et elles varient de 25% à 75 %. Actuellement, on admet que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre. Bien sûr, des valeurs du (G+C %) identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN Boucheffa (2011).

Grâce au pourcentage de G+C, la définition des actinobactéries (dont l'ADN contient un pourcentage de G +C supérieur à 55%) a été reconsidérée. Ceci a permis d'inclure dans l'Ordre des *Actinomycetales* des bactéries à Gram positif qui ne possède pas un mycélium, telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et *Micrococcus* (Wellington et Ul-Hassan, 2009) et d'exclure *Thermoactinomyces* qui a été considéré comme un actinobactérie grâce à sa forme mycélienne mais contient un taux de G+C inférieur à 55% (Yoon *et al.*, 2005).

### b. Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S et phylogénie

Le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un outil incontournable, rapide et efficace pour déterminer la position taxonomique au niveau des espèces (Rainey *et al.*, 1996; Stackebrandt *et al.*, 1997). C'est une technique très fiable pour l'identification des actinobactéries (Weisburg *et al.*, 1991 ; Cook et Meyers, 2003).

Stackebrandt et ces collaborateurs (1981, 1983), ont été les premiers à utiliser cette technique pour la taxonomie des actinobactéries. 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 du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S, utilise deux techniques de base: la PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage. Cette analyse a été utilisée ces dernières années pour les groupes à un niveau supra-génique (Famille, Ordre et même Classe) (Rainey *et al.*, 1996; Labeda et Kroppenstedt, 2000).

Les résultats sont comparés avec les séquences disponibles dans les banques génomiques libres sur internet telle qu'Ez-taxon qui regroupe les séquences de toutes les espèces-types valides des actinobactéries.

L'utilisation du séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S a permis de découvrir plusieurs genres et espèces nouveaux d'actinobactéries, de montrer aussi la diversité réelle

des différents habitats, en actinobactéries non cultivables par l'étude du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S présent dans ces habitats (Wawrik *et al.*, 2007) et de déterminer l'appartenance d'un nouveau taxon à la classe des *Actinobacteria*, qui est indiqué par une valeur de similarité supérieure à 80% (Stackebrandt *et al.*, 1997).

L'appartenance de plusieurs genres à une famille ou plusieurs familles à un seul ordre doit être validée par la présence de plus de 95% des séquences des nucléotides « signatures » dans un même groupe (Stackebrandt *et al.*, 1997; Zhi *et al.*, 2009). Deux espèces sont considérées différentes lorsque le pourcentage de similitude est inférieure à 98,65% (Kim *et al.*, 2014).

### **c. Hybridation ADN-ADN**

Cette étude est indispensable pour l'identification définitive des espèces, mais elle n'est obligatoire que pour les taxons ayant un pourcentage de similarité du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S avec les espèces valides, supérieur ou égal au pourcentage limite de la détermination de nouvelles espèces qui est de 98,65% (Kim *et al.*, 2014). Cette méthode consiste à déterminer le pourcentage de réassociation 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).

## I. MATERIEL

### 1. Echantillons de l'eau

Les actinobactéries sont recherchés dans 6 échantillons de l'eau de mer provenant des côtes de Cherchelle (Tizirine), Gouraya (Bois sacrés) et Tipaza (Port de Tipaza) ayant comme position géographique: (36°36'38.8''Nord 2°12'26.6'' Est), (36°34'11.9''Nord 1°53'26.4''Est) et (36°35'44.3''Nord 2°26'52.8''Est) respectivement appartenant tous à la wilaya de Tipaza, Algérie.

Les échantillons d'eau ont été prélevés manuellement dans des flacon de 1,5 litres, en verre (préalablement lavés et soigneusement rincés pour éliminer toute trace d'un éventuel détergeant, séchés et stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn) puis remplis, laisser renouveler plusieurs fois le contenu, en suite fermer hermétiquement sans laisser de bulles d'air dans les flacons. Les échantillons sont transportés au cours du même jour dans une glacière (4°C) et analysés avant 24h.

### 2. Germes cibles

Les microorganismes-cibles ont été utilisés pour déterminer les activités antagonistes et le spectre d'action des actinobactéries, ils proviennent tous de la collection de Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole National Supérieure (ENS) de Kouba. Le repiquage des germes cibles est effectué sur le milieu ISP2.

Les germes cibles utilisés sont :

- ✓ Deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c et *Bacillus subtilis* ATCC 6633)
- ✓ Trois bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas Aeruginosa* CIP A22).
- ✓ Trois champignons filamenteux (*Umbelopsis ramaniana* NRRL 1829, *Fusarium culmorum* et *Aspergillus carbonarius* M333).
- ✓ Une levure (*Candida albicans* IPA 200).

## II. METHODES

### 1. Isolement des actinobactéries

#### 1.1. Préparation des milieux d'isolement sélectifs

L'isolement des actinobactéries est effectué sur milieu chitine-vitamines agar (Ch-V) (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionné d'un agent antifongique (50 mg L<sup>-1</sup>) afin d'éviter les

infestations par les champignons présents dans l'eau de mer. Il est préconisé par plusieurs auteurs car il a fourni des résultats importants du point de vue quantitatif (augmentation de nombre d'actinobactéries isolés) et qualitatif (diversité des espèces) (Hayakawa et Nonomura, 1987; Zhang *et al.*, 2010, Meklat *et al.*, 2012). De plus, l'addition de certains antibiotiques (Acide nalidixique 10 mg L<sup>-1</sup>, pénicilline 25 mg L<sup>-1</sup>) permet de diminuer l'effectif microbien et d'orienter la sélection vers des isolats particuliers pouvant être intéressants comme l'ont noté Sabaou *et al.* (1998). Le tableau 2 montre les agents sélectifs ajoutés au milieu de base (chitine-vitamines).

**Tableau 2:** Compositions des milieux d'isolement en agents sélectifs.

Milieux	Antibiotiques (mg L <sup>-1</sup> ) et eau de mer
M1	Actidione seul (50)
M2	Actidione (50) + Acide nalidixique (10)
M3	Actidione (50) + Pénicilline (25)
M4	Actidione (50) + eau de mer (50% d'eau utilisée)

## 1.2. Préparation des dilutions

La suspension-mère est préparée par addition de 1 ml de l'eau de mer (prélevé d'une façon homogène à partir de l'échantillon de l'eau de mer) dans 9 ml d'eau distillée stérile (dilution 10<sup>-1</sup>). Deux autres dilutions (10<sup>-2</sup> et 10<sup>-3</sup>) sont préparées par dilution de 10 en 10 après homogénéisation de la dilution de départ par mélange vigoureux à l'aide d'un vortex.

## 1.3. Technique d'ensemencement et incubation

La méthode d'ensemencement utilisée est celle des suspensions-dilutions (Rapilly, 1968) et étalement sur milieu chitine-vitamines agar (Ch-V) coulé en boîtes de Pétri stériles. Un volume de 0,1 ml est étalé sur le milieu d'isolement à l'aide d'un râteau stérile à raison d'une répétition par dilution pour chacun des milieux M1, M2, M3 et M4.

Les boîtes ensemencées sont incubées dans une étuve à 30°C pendant 2 à 6 semaines.

## 1.4. Lecture et sélection des actinobactéries

Lors de l'incubation, les boîtes de Pétri sont périodiquement examinées à l'œil nu et au microscope optique (Zeiss) (grossissement 10 x 10 et 10 x 40) pour observer les colonies d'actinobactéries qui apparaissent à la surface de milieu d'isolement. Ces observations permettent de reconnaître, de manière préliminaire, les différents genres en présence, de sélectionner les colonies appartenant à des genres diversifiés et d'éviter de retenir un nombre élevé d'isolats susceptibles d'appartenir à une même espèce. Les caractéristiques culturelles sont ainsi soigneusement analysées et recherchées.

Les colonies qui présentent les caractéristiques morphologiques des actinobactéries ou des caractéristiques morphologiques différentes (appartenant probablement à différents genres), sont sélectionnées.

### **1.5. Purification et conservation des actinobactéries**

Les colonies sélectionnées sont prélevées délicatement à l'aide d'une pointe stérile puis purifiées par stries sur milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966). Les isolats purifiés, numérotés et codés, sont ensemencés sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis. Ces derniers sont incubés à 30°C pendant une à deux semaines puis conservés à 4°C en vue de leur identification. Le milieu ISP2, à base de glucose, d'extrait de malt et d'extrait de levure, est choisi car il constitue le milieu de référence pour la culture des actinobactéries et permet une croissance et une sporulation relativement bonnes des isolats. (Shirling et Gottlieb, 1966).

### **2. Caractérisation préliminaire des isolats**

La caractérisation des isolats repose essentiellement sur l'étude morphologique (micromorphologique et parfois macromorphologique), elle est primordiale pour la reconnaissance des genres. Dans cette étude, les souches isolées poussées sur les milieux de culture chitine vitamines agar et ISP2 sont observées au microscope optique Zeiss en utilisant les grossissements (10 x 10) et (10 x 40). L'observation est réalisée directement sur la boîte de Pétri (in situ) de manière à bien repérer les structures en place (sporulation du mycélium aérien, fragmentation ou non du mycélium du substrat, etc.)

### **3. Criblage de l'activité antibiotique sur milieu solide**

Il s'agit d'un criblage (screening) préliminaire dont l'objectif est de déterminer l'activité antibiotique de tous les isolats d'actinobactéries. La méthode utilisée est celle des cylindres d'agar sur milieu ISP2 contre les microorganismes-cibles (pathogènes et non pathogènes) cités dans le matériel.

Les actinobactéries sont ensemencées en stries très serrées et d'une manière homogène à la surface du milieu ISP2 solide (20 g L<sup>-1</sup> d'agar) Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 15 jours.

Des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre sont ensuite découpés à l'aide d'un emporte pièce en acier inoxydable stérile et déposés à la surface du milieu ISP2 semi solide (12g L<sup>-1</sup> d'agar) préalablement ensemencé par les germes-cibles séparément. Les boîtes sont placées à 4°C pendant 2h, pour permettre la diffusion des antibiotiques et empêcher momentanément la croissance des microorganismes cibles, puis incubées à 30°C pendant 24 à 48 h (24 h d'incubation pour les bactéries

et les levures et 48 h pour les champignons). La lecture des résultats est réalisée par la mesure des zones d'inhibition (zone claire) autour des cylindres d'actinobactéries.

#### **4. Caractérisation de la souche TA4**

##### **4.1. Caractérisation culturelle de la souche TA4**

###### **4.1.1. Sélection de la souche TA4**

La souche TA4 a été sélectionnée en raison de sa forte activité antagoniste sur milieu solide (choix réalisé selon les résultats obtenus lors du screening sur milieu solide).

###### **4.1.2. Caractères culturels de la souche TA4**

Les caractéristiques culturels de la souche TA4 ont été étudiées sur plusieurs milieux : International *Streptomyces* Project ISP1 et ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966), Bennett (Warren *et al.*, 1955) et gélose nutritive (Waksman, 1961).

La croissance, la couleur des mycéliums aériens et du substrat et la production des pigments solubles de la souche TA4 ont été étudiés à l'œil nu. Les couleurs ont été déterminées en utilisant une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color: ISCC-NBS) (Kelly et Judd, 1976) après 3 semaines d'incubation à 30°C.

##### **4.2. Caractérisation physiologiques de la souche TA4**

Les tests utilisés pour la caractérisation physiologique de la souche TA4 sont basés sur la méthode de Locci (1989), elle concerne l'assimilation de vingt (20) glucides et dérivés comme seules sources de carbone et la dégradation de onze (11) composés organiques. Au total cet isolat a subi une série de trente et un (31) tests physiologiques détaillés en ci-dessous.

###### **4.2.1. Utilisation des glucides et dérivés comme seules sources de carbone**

La croissance de l'isolat TA4 en présence d'une série de 20 sucres et dérivés, comme seules sources de carbone, est estimée par rapport à un témoin sans sucre, sur le milieu préconisé par Gordon *et al.* (1974) additionné de 10 g/l de chaque glucide.

Les sucres utilisés sont D-arabinose, D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-lactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, D-mélezitose, D-melibiose, le méso-erythritol, méso-inositol, D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, D-tréhalose, salicine, D-sorbitol, D-xylose. Ils sont stérilisés par filtration (filtres de 0,22 µm de diamètre) avant d'être ajoutés séparément et aseptiquement au milieu de base.

#### 4.2.2. Dégradation de divers composés organiques

Ils consistent à observer l'hydrolyse ou non de certains composés organiques. Ils sont effectués selon la méthode de (Goodfellow, 197; Gordon *et al.*, 1974) pour l'adénine, la caséine du lait, la guanine, l'hypoxanthine, la tyrosine et la xanthine, la méthode de Marchal et Bourdon. (1973) pour l'amidon et la gélatine, la méthode de Marchal et Bourdon. (1987) pour l'esculine et l'arbutine et la méthode de Sierra (1957) pour le Tween 80.

#### 4.3. Caractérisation moléculaire de la souche TA4

##### 4.3.1. Extraction de l'ADN génomique

La souche TA4 est ensemencée en stries espacées sur boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive. Des colonies, bien isolées, sont prélevées aseptiquement à l'aide de cure-dents stériles et transférées dans des tubes Eppendorfs stériles de 1,5 ml. L'ADN est extrait selon la méthode de Liu *et al.* (2000) par addition de 500  $\mu$ L d'une solution de lyse composée de 400 mM de tris-HCl [pH 8], 60 mM d'EDTA [pH 8], 150 mM de NaCl et 1% de sulfate de sodium dodecyl (SDS). Le mycélium est bien écrasé à l'aide de cônes stériles puis incubé à température ambiante pendant 15 min. Cent cinquante microlitre (150 $\mu$ l) d'une solution à pH 4,8 composée d'acétate de potassium à 5 M et de 11,5% d'acide acétique glacial sont ajoutés au mélange précédent et vortexé brièvement puis centrifugé une minute à 12 000 g. Quatre cent microlitres (400 $\mu$ l) de surnageant sont récupérés et transférés dans un autre tube à Eppendorf stérile, puis additionnés d'un même volume d'isopropanol et mélangés brièvement par inversion, avant d'être centrifugés pendant 2 min à 12 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 300  $\mu$ L d'éthanol à 70% par centrifugation pendant une minute à 12 000 g. L'ADN obtenu (le culot) est séché une nuit à température ambiante puis resuspendu dans 40  $\mu$ L d'eau bidistillée stérile puis envoyé au laboratoire de génie chimie de Toulouse pour la réalisation de la Polymerase Chain Reaction (PCR) et le séquençage.

##### 4.3.2. Amplification et séquençage de l'ADN ribosomique 16S

L'amplification de gène codant pour l'ARN 16S est réalisée par PCR en utilisant les amorces 30.10F (5'-GAGTTTGATC-CTGGCTCA-3') et 1500R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), tel que décrit par Rainey *et al.* (1996).

La séquence déterminée du gène codant pour l'ARN 16S est déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion KX113521. Elle a été comparée aux séquences homologues d'espèces microbiennes de référence répertoriées dans le serveur EzTaxon-e (disponible sur le site Internet: <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) (Kim *et al.*, 2012).

### 4.3.3. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique est réalisée en utilisant un logiciel inclus dans MEGA version 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). La séquence du gène codant pour l'ARN 16S de l'isolat TA4 est alignée grâce au programme CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Le calcul des matrices des distances d'évolution est réalisé par la méthode de Jukes et Cantor (1969) et la construction de la topologie de l'arbre phylogénétique est faite par l'algorithme du "neighbor-joining" (Saitou et Nei, 1987). La validation statistique des liens phylogénétiques établis est effectuée par le test du Bootstrap dont les valeurs sont basées sur le résultat de 1000 analyses (Felsenstein, 1985).

## 5. Effet de source de carbone sur l'activité antibiotique de la souche TA4

Le pouvoir antagoniste de la souche TA4 en changeant la source de carbone est évalué par la méthode des cylindres d'agar contre deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c et *Bacillus subtilis* ATCC 6633), une bactéries à Gram négatif (*Klebsiella pneumoniae*), un champignons filamenteux (*Fusarium culmorum*), Une levure (*Candida albicans* IPA 200).

## 6. Cinétique de l'activité antibactérienne, production et extraction de composés actifs de la souche TA4

La cinétique de production des antibiotiques de la souche TA4 a été réalisée dans le milieu ISP2 liquide (sans agar) à un pH initial de 7,2 afin de déterminer le temps de production optimale dans des conditions bien déterminées.

### 6.1. Préparation des pré-cultures

Des fioles d'erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu de culture sontensemencées par des spores et des fragments mycéliens d'actinobactérie TA4 (recueillis à partir des cultures âgées de 8 jours sur milieu ISP2 solide) selon la méthode de Xinxuan *et al.* (2010) en utilisant deux carottes de 4mm de cet isolat par 50 ml de milieu. Ces erlenmeyers sont incubés à 30°C dans un shaker en agitation permanente (250 rpm) pendant 48 h. Après incubation, les pré-cultures sont utilisées pour inoculer le milieu de production (cultures).

### 6.2. Préparation des cultures

Des erlenmeyers de 500 ml contenant chacun 100 ml de milieu de culture sontensemencés par un inoculum en phase exponentielle de croissance (âgé de 48 h) d'actinobactérie TA4. Le volume de

l'inoculation est de 3 ml (3% du volume utile). Les cultures sont incubées dans un shaker aux mêmes conditions de température et d'agitation que les prés-cultures (30°C et 250 rpm) pendant 10 jours.

### 6.3. Prélèvement

L'évolution de l'activité antimicrobienne est suivie quotidiennement pendant 10 jours par des tests d'antibiographie, sur le milieu ISP2 liquide contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c. Les méthodes utilisées sont celles de diffusion de puits préconisée par Aszalos (1986) et de diffusion des disques de papiers imbibés par les extraits organiques aux dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle, pour cela:

- Un volume de 1ml est prélevé chaque jour dans des conditions aseptiques à partir des fioles en agitation, 3 répétitions sont effectuées, ces prélèvements ont été mis dans des Eppendorfs de 2 ml stériles pour être tester par antibiographie en utilisant la méthode de diffusion de puits.
- Un erlenmeyer est enlevé quotidiennement de shaker et un volume de 12 ml est prélevé aseptiquement de cet erlenmeyer pour réaliser des extractions avec les deux solvants afin de tester les extraits organiques. Le volume restant est conservé à 4°C pour être utiliser en cas de contamination.

### 6.4. Mise en évidence de l'activité de filtrat de culture (méthode de diffusion des puits)

Cette méthode préconisée par Aszalos (1986), ne s'applique qu'aux solutions aqueuses. Après centrifugation, une aliquote de 0,1 ml du surnageant du milieu de fermentation est introduite au fond d'un puits (de 10 mm de diamètre) préalablement réalisé à l'aide d'un emporte-pièce en acier inoxydable stérile, dans le milieu ISP2 semi solide coulé en boîte de Pétri à raison de 20ml par boîte et pré-ensemencé au moment de l'expérimentation avec le germe-cible *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline.

Les boîtes sont placées à 4°C pendant 2h, puis incubées à 30°C pendant 24h. La lecture des résultats est réalisée par la mesure des zones d'inhibition (zone claire) autour des puits de la souche TA4.

### 6.5. Mise en évidence de l'activité extractible

#### 6.5.1. Extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture et choix du meilleur solvant d'extraction

L'extraction des antibiotiques sécrétés par l'actinobactérie TA4 dans le milieu de culture à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible avec l'eau correspondant au

mieux à la polarité des antibiotiques à extraire, pour cela deux solvants de polarité différente sont testés le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle ayant un index de polarité de 3,1 et 4,4 respectivement.

Chaque 24 heures, les cultures sont filtrées par centrifugation à 5000 g. 2 lots de 6 ml de filtrat de culture sont extraits avec le même volume de chacun des deux solvants utilisés. Les phases organiques sont déshydratées par passage sur un filtre contenant du sulfate de sodium anhydre (pour éliminer l'eau restante, ainsi que les contaminants hydrophiles) puis séchées sous vide (concentrés à sec).

### 6.5.2. Méthode de diffusion des disques de papier

Cette méthode s'applique aux solutions aqueuses et surtout organiques pour mettre en évidence le meilleur solvant d'extraction. Les extraits organiques de l'actinobactérie TA4 sont repris dans 120 µl dont 60 µl ont été utilisés pour imbiber des disques de papier de 6 mm de diamètre qui sont ensuite séchés sous hotte jusqu'à l'élimination totale du méthanol, puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 45 min. Les disques imprégnés et séchés sont déposés à la surface du milieu ISP2 semi solide, pré-ensemencé en masse avec le germe-cible (*Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c) et coulé en boîtes de Pétri. Celles-ci sont mises à 4°C pendant 2 heures avant d'être incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques après 24h d'incubation.

## 7. Purification des antibiotiques par l'HPLC

L'appareil utilisé est de marque Agilent, équipé des éléments suivants:

- Injecteur de type automatique Agilent 1260 infinity de type 61329B avec une boucle d'injection de 100 µl.
- Pompe quaternaire Agilent 1260 infinity de type G1315D.
- Détecteur DAD Agilent 1260 infinity de type G1315D.
- Colonne Analytique Agilent ZORBAX-SB-C18 ; 5µm (granulométrie), 4,6 x 150µm (diamètre et longueur respectivement).
- Pré-colonne ZORBAX C18 C18, 5 µm, 10 x 10 mm.
- Logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données: chemstation for LC 3D systèmes, Ver. B04, 03.

La purification des antibiotiques de l'extrait à l'acétate d'éthyle (60 µl) obtenu au jour de la production maximal est réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est réalisée par un gradient continu et linéaire, allant de 60 à 100% de méthanol pour HPLC dans l'eau bidistillée pendant 15 mn (cette phase mobile est préalablement filtrée et dégazée) puis en isocratique dans 100%

de méthanol pendant 30 mn. Le débit de l'éluant est de 1,5 ml/mn et la détection se fait à 220 nm (détection de tous les composés)

Avant l'injection des échantillons, la colonne est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 10 min. L'extrait est dilué dans 300 µl de méthanol et ultrafiltré à l'aide d'un filtre résistants aux solvants de 0,2 µm de porosité puis introduit dans l'injecteur de l'HPLC à raison de 60 µl par injection (conditions déterminées après des essais préliminaires). Les différentes fractions obtenues sont récoltées, évaporées sous vide.

### **8. Etudes spectroscopiques et spectrométriques (Spectres UV-visible)**

Le spectre UV a été enregistrée pour les sommets des pics obtenus dans le profile HPLC de cet extrait.

## **I. ISOLEMENT, DISTRIBUTION, ET CARACTERISATION PRELIMINAIRE DES ISOLATS**

### **1. Isolement des actinobacteries**

L'isolement des actinobacteries marines est effectué sur le milieu de culture chitine-vitamines agar additionné d'agents sélectifs et incubé à 30°C pendant 2 à 6 semaines. Les colonies qui ont montré, après observation à l'œil nu et au microscope optique, les caractéristiques morphologiques des actinobacteries, en particulier la formation du mycélium aérien et du mycélium de substrat avec des filaments très fins, sont considérées comme des actinobacteries. Les actinobacteries ont été retrouvés dans les six (6) échantillons analysés.

### **2. Sélection et distribution des isolats**

19 isolats seulement ont été sélectionnés pour la présente étude, Nous avons prélevé 8 isolats à partir de la côte de Cherchelle, 7 isolats à partir de la côte de Tipaza et 4 isolats à partir de la côte de Gouraya. 10 isolats ont été prélevés du milieu M1, 5 isolats du milieu M2, 1 isolat du milieu M3 et 3 isolats du milieu M4 (répartition des 19 isolats selon le milieu) (Tableau 3). Cette sélection est basée essentiellement sur la diversité culturelle et morphologique remarquée lors de l'observation à l'œil nue et au microscope optique. Les isolats prélevés appartiennent à des genres habituellement fréquents ou peu fréquents et facilement reconnaissables.

**Tableau 3.** Distribution des actinobacteries marines dans les prélèvements d'eau côtière analysés sur milieu chitine vitamines agar.

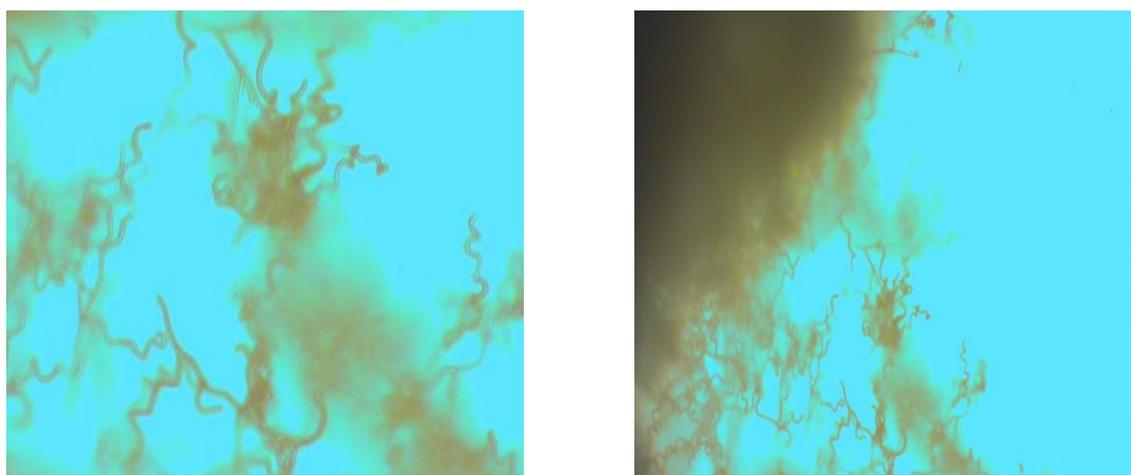
Côte	Souche	Milieu Ch-V	Dilution
<b>Cherchelle</b>	CA1	M1	10 <sup>-3</sup>
	CA2	M1	10 <sup>-1</sup>
	CA3	M1	10 <sup>-2</sup>
	CA4	M1	10 <sup>-2</sup>
	CA5	M2	10 <sup>-3</sup>
	CA6	M2	10 <sup>-2</sup>
	CA9	M3	10 <sup>-1</sup>
	CA10	M4	10 <sup>-2</sup>
<b>Gouraya</b>	GA1	M1	10 <sup>-1</sup>
	GA2	M2	10 <sup>-2</sup>
	GA3	M1	10 <sup>-2</sup>
	GA4	M2	10 <sup>-3</sup>
<b>Tipaza</b>	TA4	M1	10 <sup>-1</sup>
	TB1	M4	10 <sup>-1</sup>
	TB2	M4	10 <sup>-1</sup>
	TB3	M2	10 <sup>-1</sup>
	TBF1	M1	10 <sup>-1</sup>
	TBF2	M1	10 <sup>-1</sup>
	TBF4	M1	10 <sup>-1</sup>

### 3. Caractérisation préliminaire des isolats

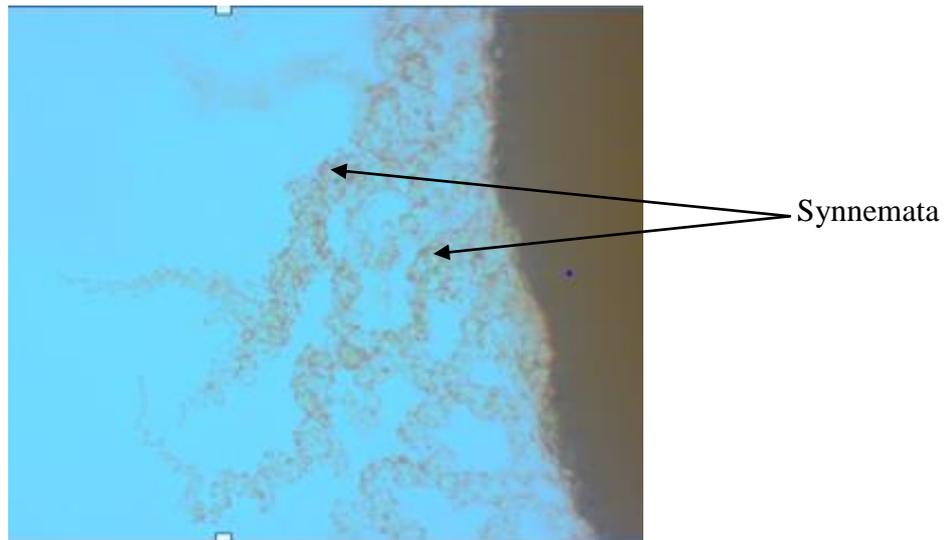
L'étude morphologique des 19 isolats d'actinobacteries marines est effectuée sur le milieu chitine-vitamines agar et ISP2. D'une manière générale, la croissance est bonne sur ces deux milieux. Lors de l'isolement initial des colonies, nous avons pu classer sur la base des observations micromorphologique et parfois macromorphologique et ce, d'une manière présomptive, tout les isolats dans quatre genres: *Streptomyce* (13 souches), *Nocardiopsis* ou *Saccharothrix* (5 souches), *Rhodococcus* (1 souche) (Tableau 4)

**Tableau 4.** Caractérisation préliminaire des genres des isolats d'actinobactéries marines

Souches	Caractéristiques	Genres
CA3, CA5, CA9, CA10, GA2, GA3, GA4, TA4, TB2, TB3, TBF1, TBF2 et TBF4	Des mycéliums aériens constitués de filaments ramifiés qui se terminent par de longues chaînes de spores portées par des sporophores. Les chaînes de spores sont de types plus ou moins variables selon les souches. Elles sont soit spiralées, soit droites à flexueuses. Cette micromorphologie est typique à celle des actinomycètes appartenant au genre <i>Streptomyces</i> (Figure 2)	<i>Streptomyces</i>
CA1, CA2, CA4, CA6 et GA1	Tous les isolats de ce groupe présentent des caractéristiques micromorphologiques très proches. un mycélium aérien (MA) ramifié et fragmenté de manière anarchique en éléments plus ou moins longs, non mobiles aboutissant à la formation de chaînes de spores en zigzag. Le mycélium du substrat (MS) se fragmente parfois.	<i>Nocardiopsis</i> ou <i>Saccharothrix</i>
TB1	Colonies caractérisées par leur couleur rouge et formation de synnemata aérienne constituée de filaments linéaires qui se projettent vers le haut (Figure 3).	<i>Rhodococcus</i>



**Figure 2.** Micromorphologie en microscopie optique de l'isolat TA4 cultivé pendant trois semaines à 30 °C sur le milieu ISP2 (G × 400 avec effet de zoom).



**Figure 3.** Micromorphologie en microscopie optique de l'isolat TB1 cultivé pendant trois semaines à 30 °C sur le milieu ISP2 (G × 400 avec effet de zoom).

## II. CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DES SOUCHES D'ACTINOBACTERIES SUR MILIEU SOLIDE

Le pouvoir antagoniste des 19 souches d'actinobactéries sélectionnées a été testé par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu ISP2 contre des bactéries, des champignons filamenteux et une levure pour évaluer leur potentiel de production des antibiotiques. Les résultats de ces tests sont consignés dans le Tableau 5.

**Tableau 5.** Propriétés antagonistes des isolats d'actinobactéries marines.

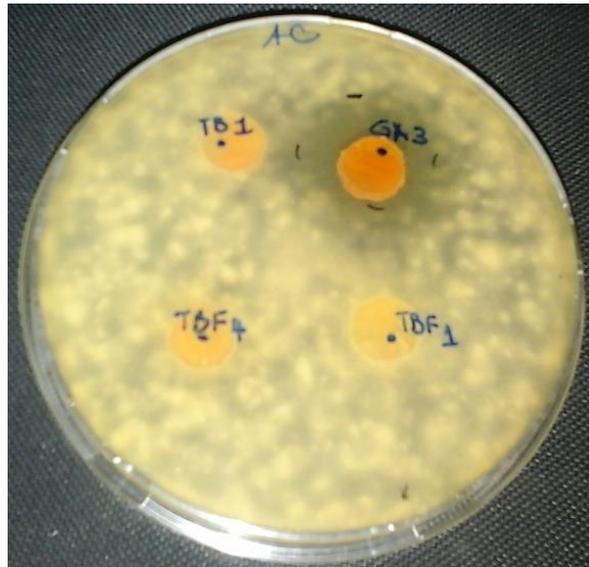
Genre	Souche	Activité (mm) contre:							
		Bs	Sa	Ec	Ps	Ac	Fc	Ur	Ca
<i>Nocardiopsis</i> ou <i>Saccharothrix</i>	CA1	7,5 R	15	-	-	-	-	-	-
	CA2	7,5	15	-	-	7,5R	15	-	-
	CA4	5	22	-	-	4 R	-	5	-
	CA6	5 R	10	-	-	5 R	-	10	-
	GA1	7,5R	15	-	-	4R	-	10	-
<i>Rhodococcus</i>	TB1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i>	CA3	7,5	10			2,5 R	-	6	-
	CA5	-	-	-	-	-	-	-	-
	CA9	-	7	-	-	4R	-	2R	-
	CA10	7,5R	12	-	-	5R	-	6	-
	GA2	-	13	-	-	5R	-	2,5R	-
	GA3	3	-	-	-	10R	-	1	10R
	GA4	5R	15	-	-	5R	-	12	-
	TA4	22	30	-	-	-	-	-	-
	TB2	-	10	-	-	-	-	-	-
	TB3	7	23	-	-	-	-	-	-
	TBF1	-	-	-	-	-	-	-	-
	TBF2	8	25	-	-	-	-	-	-
	TBF4	7	19	-	-	-	-	-	-

- = absence d'activité, R= Ralentissement. Le diamètre du disque n'est pas inclus dans les valeurs.

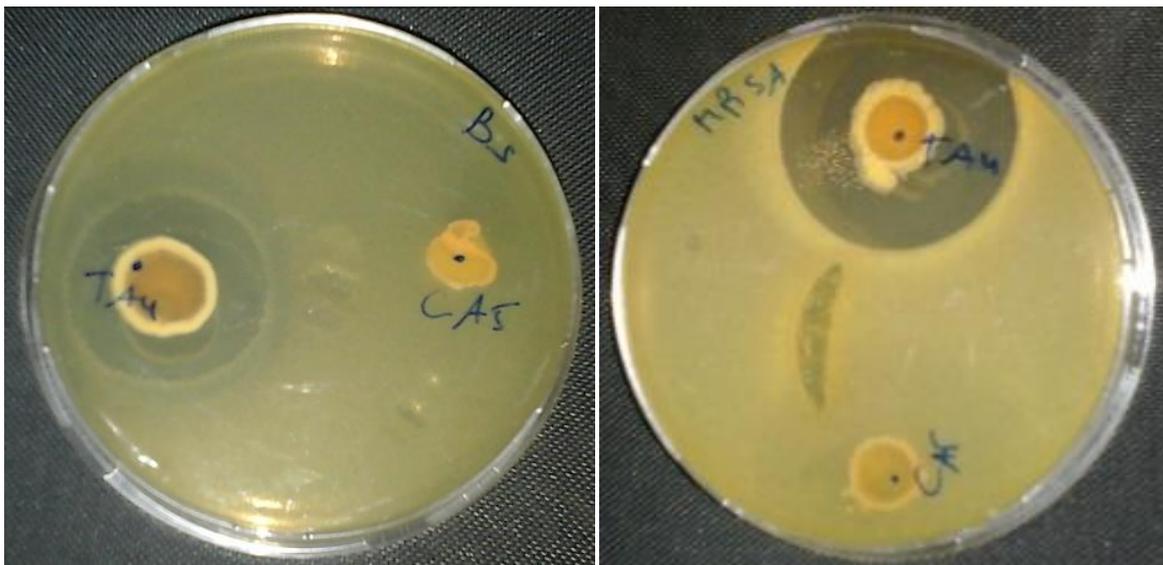
**Bs:** *Bacillus subtilis* ATCC 6633; **Sa:** *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c; **Ec:** *Escherichia coli* ATCC 10536; **Ps:** *Pseudomonas Aeruginosa* CIP A22; **Ac:** *Aspergillus carbonarius* M333; **Fc:** *Fusarium culmorum*; **Ur:** *Umbelopsis ramaniana* NRRL 182; **Ca:** *Candida albicans* IPA 200).

Sur les 19 souches d'actinobactéries testés, 16 se sont montrées actives contre au moins un germe-cible. En revanche, 3 souches n'ont présenté aucune activité (TB1, CA5 et TBF1). Parmi les souches actives 6 (environ 37,5%) souches présentent une activité antibactérienne uniquement et 10 (62,5%) une activité à la fois antibactérienne et antifongique. Les souches CA2 et GA3 sont les seules qui présentent une activité contre *Fusarium culmorum* et *Candida albicans* IPA 200 respectivement.

L'activité antifongique (Figure 4) obtenue est moyenne à faible, avec une zone d'inhibition maximale de 12 mm obtenue par la souche GA4 contre *Umbelopsis ramaniana*. Par contre, l'activité antibactérienne est forte pour la majorité des souches actives (30 mm d'inhibition comme activité maximale obtenue par la souche TA4 contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline) (Figure 5).



**Figure 4.** Activité antifongique de quelques souches d'actinobactéries contre *Aspergillus carbonarius* M333.



**Figure 5.** Activité antibactériennes de la souche TA4 contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c (MRSA) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Bs).

Il est intéressant de noter que toutes les souches de *Nocardiopsis* / *Saccharothrix* présentent des activités antimicrobiennes, nous notons certaines variations dans les activités et ce, pour ces souches qui sont estimées appartenir au même genre. Ensuite viennent les souches appartenant au genre *Streptomyces* avec 84,6% des souches actives. Cependant, l'unique isolat de *Rhodococcus* (TB1) n'a montré aucune activité.

## DISCUSSION

L'isolement des actinobactéries marines est effectué sur le milieu de culture chitine-vitamines agar additionné d'agents sélectifs et incubés à 30°C pendant 2 à 6 semaines, ce milieu est préconisé par différents auteurs pour l'isolement des actinobactéries de sol (Hayakawa et Nonomura, 1984; Boudjella, 1994; Pathom-aree *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010), il est utilisé pour l'isolement des actinobactéries marines car l'hypothèse de l'origine de ces derniers correspondrait à des souches terricoles adaptées à la salinité marine (Larpen et Sanglier, 1989) existe encore, et même car il n'y a pas des stratégies ou méthodes spécifiques lors de travail sur les milieux marins donc on utilise les mêmes méthodes appliqués sur les milieux terrestres .

Ce milieu est à base de sels minéraux et de chitine comme unique source de carbone et d'azote, ce substrat est l'élément sélectif qui favorise la croissance des actinobactéries au détriment des bactéries non mycéliennes et des champignons en produisant des chitinases (Domergues et Mangenot, 1970). En effet, les actinobactéries dégradent mieux la chitine par rapport aux autres microorganismes qui la dégradent difficilement ou pas. Ce milieu contient aussi des vitamines du groupe B comme facteurs de croissance et cela permet aux genres relativement rares et qui sont souvent auxotrophes pour ces vitamines de croître (Hayakawa et Nonomura, 1984).

Les actinobactéries ont été retrouvées dans les six (6) échantillons analysés ce qui confirme les résultats intéressants obtenus par plusieurs chercheurs. Ces résultats ont montré la richesse et la diversité de biotope marin en actinobactéries, qui parfois dépassent les autres groupes de microorganismes en densité (Walker and Colwell, 1975; Barcina *et al.*, 1987; Goodfellow and Haynes, 1984; Jensen *et al.*, 1991).

La présence des actinobactéries dans des échantillons d'eau et de sédiments marins a été rapportée par plusieurs auteurs: Grein et Meyers (1958); Walker et Colwell (1975); Barcina *et al.* (1987); Jensen *et al.* (1991); Siva Kumar (2001).

19 isolats seulement ont été sélectionnés pour le présent travail. L'isolement des actinobactéries du milieu marins est caractérisé toujours par un nombre restreint des isolats, ces chiffres relativement faibles peuvent être dus à la profondeur des stations d'échantillonnage (Weyland, 1981). Cela est évident par le rapport de Chandramohan *et al.* (1986), qui n'a enregistré aucune colonie d'actinobactéries à partir des sédiments d'origine de l'océan indien même en utilisant des milieux sélectifs, cette constatation n'argumente pas notre cas, car nos prélèvements proviennent des côtes. En outre, Sponga *et al.* (1999), et Zheng *et al.* (2000) ont également rapporté un petit nombre d'actinobactéries marines, bien que les questions sur la nature marine indigène de actinobactéries sont difficiles à traiter expérimentalement, certains progrès ont été réalisés dans cet égard et les

actinobactéries marines ont été soulignées comme espèces natives du milieu marin et de ce fait les méthodes d'isolement doivent être adaptées à cette origine (Moran *et al.*, 1995; Urakawa *et al.*, 1999). Enfin, la faible population isolée peut être attribuée à l'origine douteuse des actinobactéries marines qui ont été interrogées fréquemment (Grein et Meyers, 1958; Okazaki et Okami, 1975; Goodfellow et Haynes, 1984). Cette argument est plus valide étant donné que les actinobactéries sont plus abondantes dans les sols terrestres que dans le milieu marin (Goodfellow et Haynes, 1984), montrant divers degrés de tolérance au sel (Okazaki et Okami, 1975) et produisant des spores qui migrent vers un grand nombre du rivage dans la mer où ils peuvent rester viables pour une période de temps indéterminée (Jensen *et al.*, 1991)

La majorité des isolats ont été prélevés du milieu M1 car ce milieu ne contient que l'actidione (antifongique) comme unique agent sélectif ce qui permet la croissance de toutes les actinobactéries sans favoriser un genre par rapport à un autre. Par contre les milieux M2 et M3 sont caractérisés par un nombre moins d'isolats parce que ces milieux ont été additionnés en plus de l'actidione (antifongique) des antibiotiques sélectifs qui sont l'acide nalidixique et la pénicilline respectivement ce qui favorise la diversité des isolats et l'élimination ou la diminution du nombre de bactéries non mycéliennes indésirables (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998). Mais ces antibiotiques peuvent inhiber la croissance de certaines actinobactéries également. Bien que l'ajout d'antibiotiques sélectifs soit souvent utilisé pour l'obtention de genres et d'espèces d'actinobactéries rares (Boudjella, 1994) autres que les *Streptomyces* qui sont dominants dans les sols (Sabaou *et al.*, 1998), nous l'avons utilisé dans ce cas dans le but d'avoir une plus grande diversité de genres, et aussi d'avoir des isolats de *Streptomyces* assez particuliers qui pourraient être fortement antagonistes. Le Milieu M4 additionné de 50% de l'eau de mer a permis de sélectionner seulement une seule actinobactérie malgré que l'ajout de l'eau de mer dans la préparation des milieux d'isolement des actinobactéries est préconisé par plusieurs auteurs (Tracy *et al.*, 2002 et Jiang *et al.*, 2006).

La majorité de la population des actinobactéries isolée dans cette étude est constituée par un seul genre, *Streptomyces*. En outre, un certain nombre de *Nocardiopsis* / *Saccharothrix* et *Rhodococcus* ont également été isolés. Peu d'études ont été dirigées spécifiquement aux actinobactéries marines, mais les preuves disponibles confirment une grande diversité taxonomique et distributions à travers les habitats marins (Weyland, 1981; Goodfellow et Haynes, 1984; Takizawa *et al.*, 1993). La dominance assez nette des *Streptomyces* est un fait bien connu (Alexander, 1971) et souvent été rapportée dans la littérature (Goodfellow et Williams, 1983; Sabaou *et al.*, 1998). De nombreuses études ont été réalisées, plusieurs genres ont été découverts mais le genre *Streptomyces* d'origine marine a été plus fréquemment enregistré (Omura, 1992). De même, *Streptomyces* représentaient environ 90% à 95% du

total actinobactéries trouvés dans divers types de sol (Lechevalier, 1964; Lechevalier et Lechevalier, 1967). Grein et Meyers (1958) ont également signalé la dominance du genre *Streptomyces*, tandis que les espèces de *Nocardia* et *Micromonospora* représentait environ 20% du total de nombre d'isolats. Ellaiah et Reddy (1987) ont isolé des actinobactéries à partir des sédiments marins et ont signalé la prédominance des deux genres *Streptomyces* et *Micromonospora* avec le même pourcentage. Cependant Sponga *et al.* (1999) ont rapporté que les sédiments marins ont donné une moyenne des actinobactéries isolées de 50% de *streptomyces* et 50% des actinobactéries rares, y compris *Micromonospora*. Contrairement aux résultats précédents, Jensen *et al.* (1991) et Mincer *et al.* (2002) ont travaillé sur les sédiments marins et ont signalé que le genre *Micromonospora* est prédominant, Colquhoun *et al.* (1998) ont travaillé sur des sédiments de 300 à 10897m de l'océan pacifique, ils ont démontré que les trois genres *Micromonospora*, *Rhodococcus* et *Streptomyces* prédominent.

Le deuxième genre qui prédomine dans nos isolats et le genre *Nocardiopsis* ou *Saccharothrix* avec 5 souches. Les souches de *Nocardiopsis* ont été isolées à partir de l'environnement marin par Luis *et al* (2004), Shumei *et al* (2007), Harald *et al* (2007).

Le genre *Nocardiopsis* est connu pour sa halotolérance (Li *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009), ce qui explique sa présence possible dans le milieu marin. Le genre *Saccharothrix* est signalé dans les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4000 m de profondeur (Goodfellow et Williams, 1983).

Les plus grandes activités antibiotiques ont été obtenues contre les bactéries à Gram positif, surtout contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c, ce qui concorde avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui mentionnent la sensibilité des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif (Sabaou *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 2002; Meklat, 2012).

L'activité antimicrobienne est retrouvée chez les cinq isolats de *Nocardiopsis*/*Saccharothrix*. Cette activité est souvent rapportée dans la littérature. En effet, de nombreux travaux signalent que la grande majorité des isolats appartenant au genre *Nocardiopsis* sont actifs (Dolak *et al.*, 1980; Sun *et al.*, 1991; Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2005; Meklat, 2012), ce qui confirme la place importante de ce genre dans la production des antibiotiques.

Le pouvoir antagoniste exprimé par le genre *Saccharothrix* n'est pas étonnant en soi, vu que ce genre est connu comme recelant des souches et espèces productrices de plusieurs antibiotiques d'une grande diversité structurale et à spectre d'action intéressant. L'activité des molécules produites par les

souches de *Saccharothrix* est surtout dirigée contre les bactéries à Gram positif, parfois contre les champignons et rarement contre les bactéries à Gram négatif (Wang *et al* 2000; Lamari *et al.*, 2002; Zitouni, 2005). Néanmoins, une activité antibactérienne importante dirigée contre des bactéries à Gram négatif a déjà été signalée par Suzuki *et al.* (1991) chez *Saccharothrix mutabilis subsp. chichijimaensis* productrice de tétrazomine, et plus récemment, par Aouiche *et al.* (2012) chez *Saccharothrix sp.* PAL54 productrice de chloramphénicol.

Nos souches de *Streptomyces* ont montré une activité contre les bactéries à Gram positif et les champignons mais pas contre les bactéries à Gram négatifs ce qui concorde avec les résultats obtenus par Bouras *et al.* (2013) et Aouich *et al.* (2013) concernant les bactéries à Gram positif et les champignons, et ne concordent par rapport à leur activité contre les bactéries à Gram négatif, car leurs souches de *Streptomyces* ont montré une activité intéressante contre ce groupe de bactéries. Une souche seulement (GA3) présente une activité contre la levure testée. Cela ne corrobore pas avec ce qui est cité dans la littérature pour les souches de *Streptomyces* connues pour leurs spectre d'action large (Thakur *et al.*, 2007 ; Valanarasu *et al.*, 2008; Duraipandiyan *et al.*, 2010;). Récemment une souche de *Streptomyces mutabilis* a été isolée du sol saharien, cette dernière a présentée une activité antifongique contre la levure *C. albicans* et autre champignons pathogènes par la production de 2,4-Di-tert-butylphenol (Belghit *et al.*, sous presse).

Approximativement, plus de deux tiers des milliers d'antibiotiques naturels ont été isolés principalement par ce genre (Omura, 1992). Plusieurs espèces de *Streptomyces* d'origine marines ont été récemment décrites et étudiées pour leur potentiel à produire des métabolites secondaire, y compris la production des antibiotiques. Ces antibiotiques sont originaux et particuliers par rapport à ceux produits par les actinobactéries terrestres (Sanchez *et al.* 2003; Maskey *et al.*, 2004; Macherla *et al.* 2005).

Nous avons isolé également une seule souche de *Rhodococcus* qui n'a montré aucune activité contre tous les germes testés. Cependant, le genre *Rhodococcus* est signalé pour la production de certains antibiotiques comme, Quinolone produit par *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824 (Wataru et Tomohiro, 2008).

Le milieu marin est considéré comme une source inexplorée de nouveaux produits naturels bioactifs (Fenical, 1993; Gulder et Moore, 2009; Molinski *et al.*, 2009). Leur diversité structurelle rend d'elles une cible prometteuse pour la découverte de nouveaux antibiotiques et de molécules bioactives en général (Newman et Cragg, 2007).

### III. CARACTERISATION DE LA SOUCHE TA4

#### 1. Caractères cultureux de la souche TA4

Les caractéristiques culturelles de la souche TA4 ont été étudiées sur différents milieux: International *Streptomyces* Project (ISP1, ISP2), Bennett et gélose nutritive.

L'isolat TA4 a une bonne croissance sur tous les milieux de cultures utilisés. Le mycélium aérien est blanc sur ISP1, brun grisâtre clair sur ISP2, gris clair sur Gélose Nutritive et Bennett (Figure 6). Le mycélium de substrat est jaune claire à jaune orangé modérée sur ISP1 et brun olive modérée sur ISP2, gélose nutritive et Bennett.



**Figure 6.** Macromorphologie montrant le mycélium aérien de l'isolat TA4 poussant sur milieu ISP1 (à gauche), ISP2 (au milieu), Gélose nutritive et Bennett (à droite).



**Figure 7.** Macromorphologie montrant le mycélium de substrat de l'isolat TA4 poussant sur milieu ISP1 (à gauche), ISP2, Gélose nutritive et Bennett (à droite).

#### 2. Caractères physiologique de la souche TA4

L'isolat TA4 a subi une série de trente et un (31) tests physiologiques, basé sur la méthode de Locci (1989), elle concerne l'assimilation de vingt (20) glucides et dérivés comme seules sources de carbone et la dégradation de onze (11) composés organiques. Cet isolat utilise la totalité des glucides et

dérivés comme seules sources de carbone, il dégrade l'ensemble des composés organiques testés à l'exception du Guanine et Esculine (Tableau 6).

**Tableau 6.** Caractéristiques physiologiques des isolats TA4.

Tests physiologiques	Souche TA4
<b>Utilisation de :</b> Arabinose, cellebiose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, mannose, melezitose, melibiose, méso-erythritol, méso-inositol, raffinose, rhamnose, ribose, tréhalose, salicine, sorbitol, xylose.	+
<b>Dégradation de :</b> Adénine, amidon, arbutine, caséine de lait, gélatine. hypoxanthine, tween 80, tyrosine, xanthine. Esculine, Guanine.	+ -

+ = test positif, - = test négatif

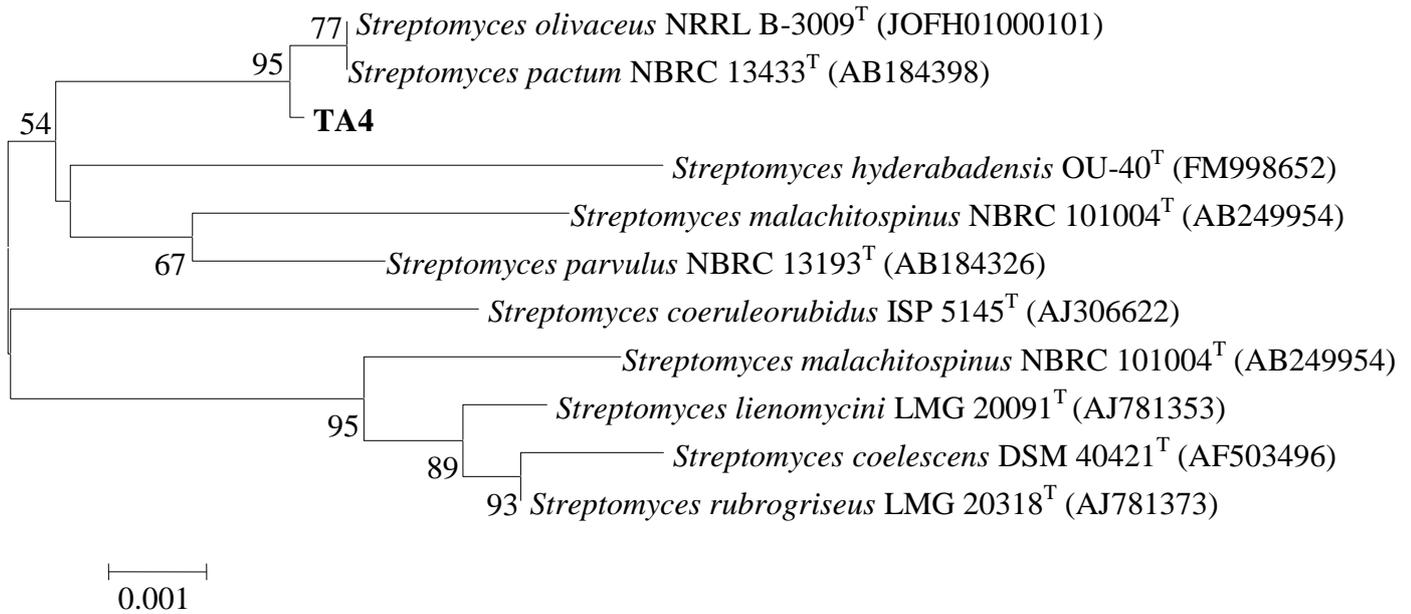
### 3. Caractérisation moléculaire de l'isolat TA4

L'alignement de la séquence du gène qui code pour l'ARNr 16S de cette souche dans EzTaxon-e a confirmé son appartenance au genre *Streptomyces*. Elle a montré une similitude de 99,79 % avec les espèces *Streptomyces olivaceus* et *S. pactum* (Tableau 7). La souche TA4 forme un cluster distinct avec ces deux espèces dans l'arbre phylogénétique (Figure 8) (manuel de Bergy, 2012)

**Tableau 7.** Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16s de l'isolat TA4 avec les souche-type des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*.

Espèce	Souche-type (n° d'accension)	Numéro de la séquence	% de similarité avec TA4
<i>S. olivaceus</i>	NRRL B-3009 <sup>T</sup>	JOFH01000101	<b>99,79*</b>
<i>S. pactum</i>	NBRC 13433 <sup>T</sup>	AB184398	<b>99,79*</b>
<i>S. parvulus</i>	NBRC 13193 <sup>T</sup>	AB184226	99,22
<i>S. hyderabadensis</i>	OU-40 <sup>T</sup>	FM998652	99,06
<i>S. malachitospinus</i>	NBRC 101004 <sup>T</sup>	AB24999954	99,00
<i>S. coeruleorubidus</i>	ISPI 5145 <sup>T</sup>	AJ306622	98,99
<i>S. lienomycini</i>	LMG 20091 <sup>T</sup>	AJ781353	98,93
<i>S. rubrogriseus</i>	LMG 20318 <sup>T</sup>	AJ781373	98,93
<i>S. marokkonensis</i>	API <sup>T</sup>	AJ965470	98,86
<i>S. coelestis</i>	DSM 40421 <sup>T</sup>	AF503496	98, 79

\* = pourcentage de similarité le plus élevé.



**Figure 8.** Arbre phylogénétique basé sur l’analyse des séquences du gène codant pour l’ARNr 16S, montrant la relation entre l’isolat TA4 et les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*. La barre représente une substitution pour 1000 nucléotides. Les valeurs du Bootstrap (supérieures à 50 %) basées sur 1000 analyses sont indiquées au niveau des nœuds de l’arbre.

#### IV. EFFET DE SOURCES DE CARBONES SUR L’ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE LA SOUCHE TA4

L’effet de source de carbone sur l’activité antibiotique de l’isolat d’actinobactérie sélectionné TA4 a été testé par la méthode des cylindres d’agar sur le milieu ISP2 contre des bactéries, un champignon filamenteux et une levure pour évaluer leur potentiel de production des antibiotiques. Les résultats de ces tests sont consignés dans le Tableau 8.

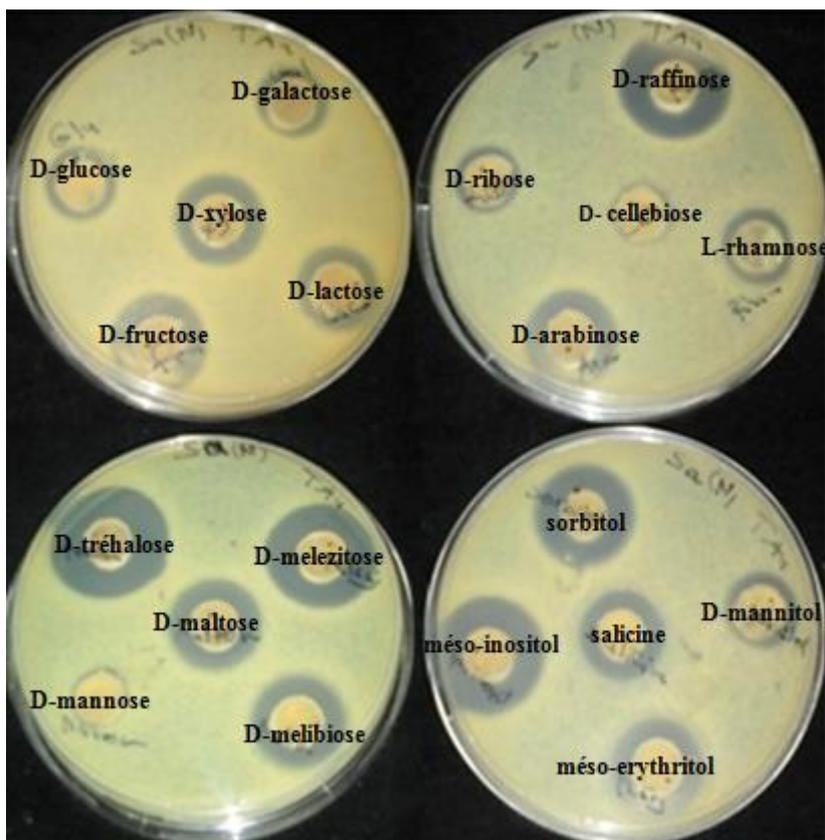
**Tableau 8.** Effets de source de carbone sur l'activité antibiotique de la souche TA4.

Glucides et dérivés	Activité (mm) contre	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)
D-arabinose	6	10
D-cellebiose	-	3R
D-fructose	5	11
D-galactose	-	7
D-glucose	-	7
D-lactose	3	10
D-maltose	5	10
D-mannitol	-	6
D-mannose	-	2
D-melezitose	10	15
D-melibiose	6	10
Méso-erythritol	3	-
Méso-inositol	10	16
D-raffinose	7	16
L-rhamnose	-	5
D-ribose	-	5
D-tréhalose	11	17
Salicine	2	9
D-sorbitol	9	13
D-xylose	5	11

– = absence, R= ralentissement, le diamètre de disque n'est pas inclus dans les valeurs.

Aucune activité n'a été obtenue par la souche TA4 contre *Klebsiella pneumoniae*, *Fusarium culmorum* et *Candida albicans*.

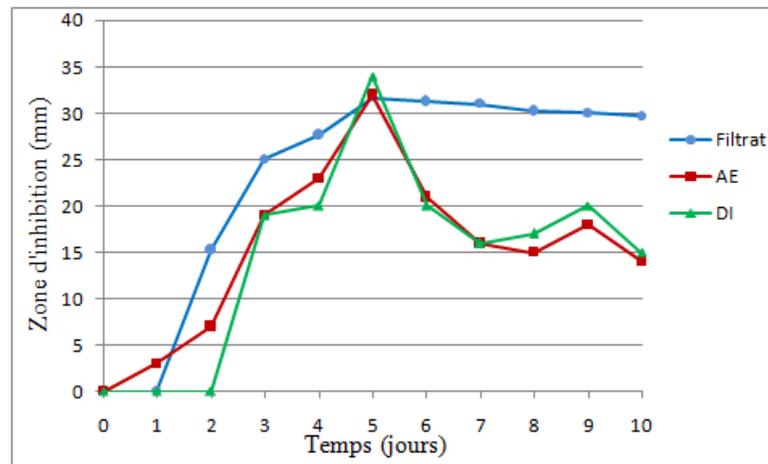
L'activité de la souche TA4 est variable suivant les microorganismes-cibles et selon le milieu de culture (Figure 9). Aucune activité antifongique n'est enregistrée par la souche TA4 sur les différents milieux étudiés donc le champignon mycélien et la levure testée ne sont pas sensibles aux antibiotiques produits par cette souche. Par contre, son activité antibactérienne est faible à moyenne avec une activité maximale de 11 mm et 17 mm des diamètres d'inhibition contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline respectivement, obtenue sur le milieu de base additionné de D-tréhalose. Elle a montré une activité contre les bactéries à Gram positif seulement mais pas contre la bactérie à Gram négatif, le champignon ou la levure testés.



**Figure 9.** Effet de différentes sources de carbone sur l'activité antibactériennes de la souche TA4 contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c.

## V. CINÉTIQUE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE, PRODUCTION ET EXTRACTION DES COMPOSÉS ACTIFS DE LA SOUCHE TA4

L'évolution de l'activité antibactérienne est testée contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c, sur le milieu ISP2 liquide pendant 10 jours d'incubation. Elle est suivie quotidiennement par la méthode de diffusion de puits, également par la méthode de diffusion des disques de papiers imbibés par les extraits organiques aux dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle (Figure 10).



**Figure 10.** Cinétique de l'évolution de l'activité antibactérienne dans le milieu ISP2 liquide, contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c.

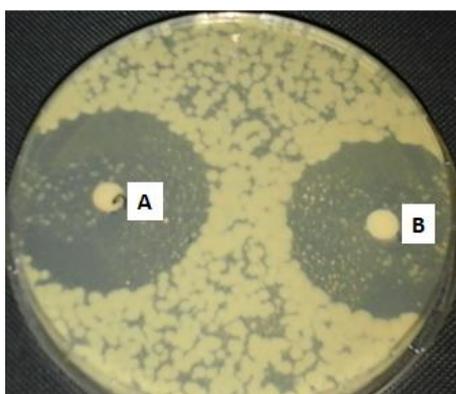
**Filtrat:** activité du filtrat (méthode de diffusion de puits); **AE:** extrait à l'acétate d'éthyle et **DI:** extrait au dichlorométhane (méthode de diffusion des disques de papiers. Les diamètres des puits et des disques ne sont pas inclus dans les valeurs des zones d'inhibition.

L'activité antibactérienne de la souche TA4 contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c débute à partir de 2<sup>ème</sup> jour d'incubation pour l'extrait aqueux et à partir de premier et de 3<sup>ème</sup> jour d'incubation pour les extraits organiques de l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane respectivement, elles atteignent leurs maximums au même 5<sup>ème</sup> jour d'incubation. Au de là, l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux ne diminue que légèrement (presque reste stable) par contre les activités antibactériennes des extraits organiques diminuent, Ces activités restent persistantes jusqu'à la fin de l'incubation (Figures 11 et 12).

Les deux solvants utilisés (l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane) permettent l'extraction des antibiotiques produits par l'actinobactérie TA4 dans le milieu ISP2 liquide. Ils extraient l'activité contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c mais l'acétate d'éthyle extrait légèrement mieux les antibiotiques par rapport au dichlorométhane.



**Figure 11.** Cinétique de l'activité antibiotique de la souche TA4 contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c par la méthode de diffusion des puits pendant 10 jours.

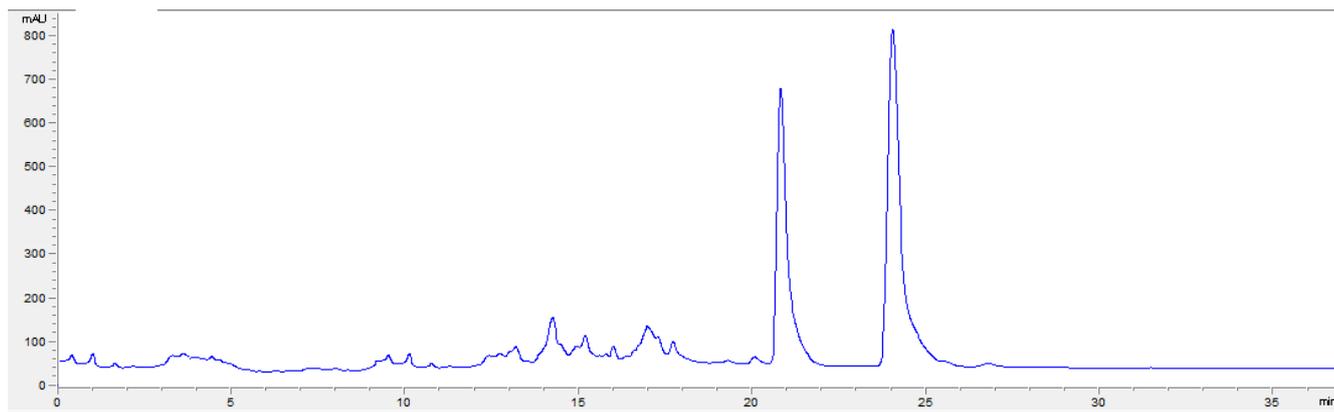


**Figure 12.** Activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle (A) et au dichlorométhane (B) au 5<sup>ème</sup> jour d'incubation contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c.

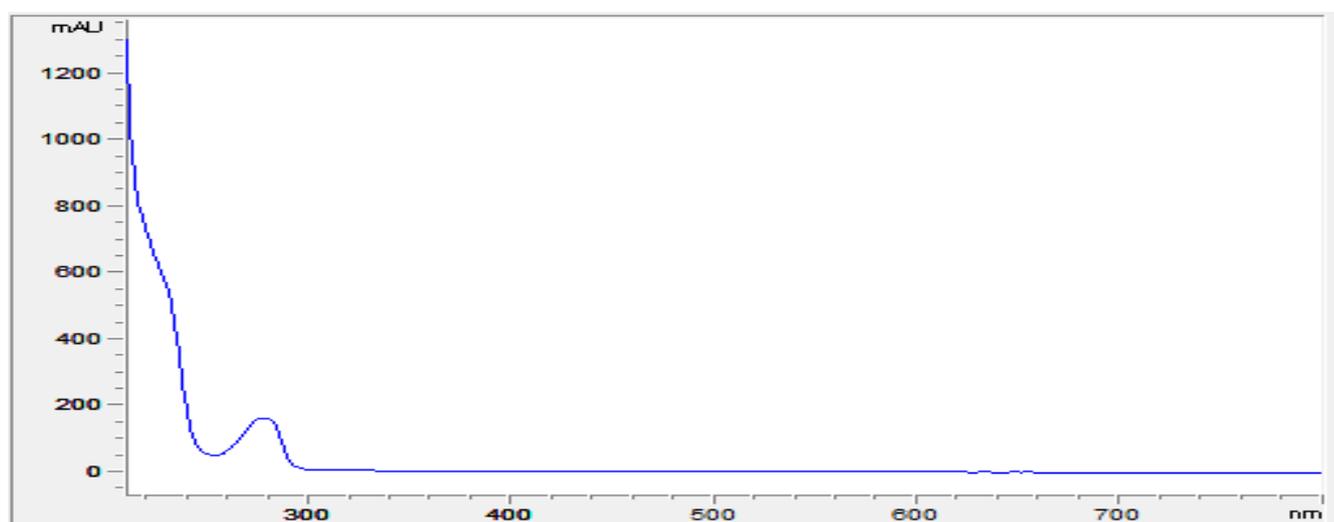
## VI. ANALYSE PAR HPLC ET SPECTROPHOTOMETRE UV-VISIBLE

L'analyse des antibiotiques de l'extrait à l'acétate d'éthyle (60 $\mu$ l) obtenu au jour de la production maximal (5<sup>ème</sup> jour) est réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) montre la présence de deux composés majoritaires nommés A et B élués respectivement après 21 et 24 min à 100 % de méthanol (Figure 13).

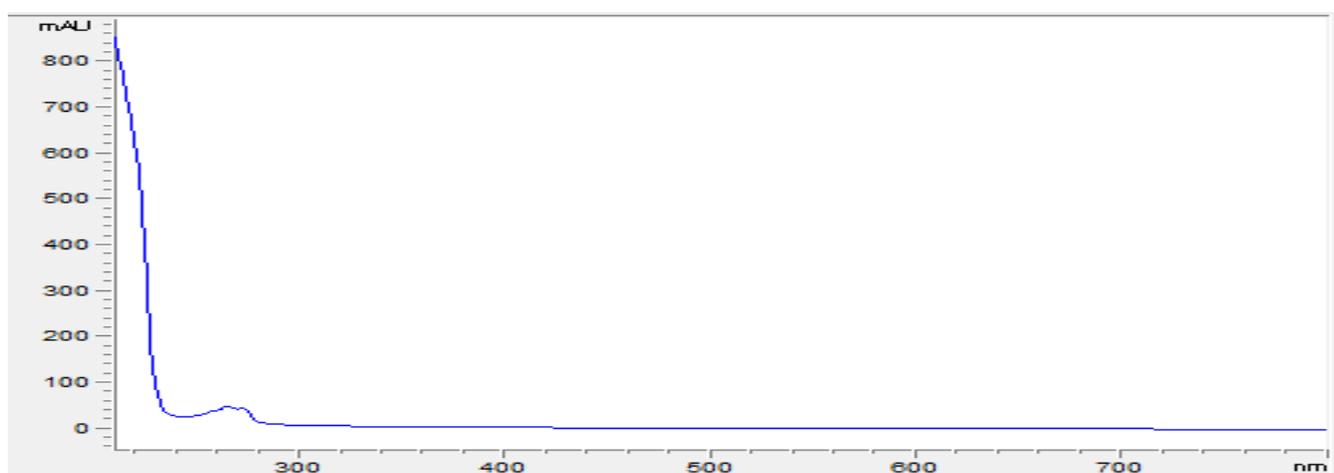
Le spectre UV-visible montre des maxima d'absorption entre 270 et 280 nm (Figures 14 et 15).



**Figure 13.** Profile d'éluion en HPLC (obtenue à 220 nm) de l'injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle.



**Figure 14.** Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique A de la souche TA4.



**Figure 15.** Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique B de la souche TA4.

## DISCUSSION

Le pourcentage de similitude de la souche TA4 avec les espèces *Streptomyces olivaceus* est *S. pactum* est égale à 99,79 % (manuel de Bergy, 2012). Il est supérieur à la limite de séparation entre les espèces (98,65%) (Kim *et al.*, 2014). Cependant, les deux espèces *S. olivaceus* et *S. pactum* partagent une similarité de 100% de leurs ADNr 16S, ce qui ne laisse suggérer que la souche TA4 pourrait constituer une nouvelle espèce, sous réserve d'une hybridation ADN-ADN avec les espèces les plus proches. Ce résultat est soutenu par les différences physiologiques de la souche TA4 avec ces deux espèces. La souche TA4 utilise l'arabinose, la xylose, le mannitol, le rhamnose, le raffinose et le meso-inositol comme seules source de carbone par contre l'espèce *S. pactum* n'utilise aucun de ces sucres et l'espèce *S. olivaceus* n'utilise pas les deux derniers sucres (nous notons que peu de données sont disponibles pour le profil physiologique de *S. olivaceus*) (manuel de Bergy, 2012).

La variabilité de l'activité de la souche TA4 selon les microorganismes-cibles et selon le milieu de culture nous laisse penser à la sécrétion de plus d'un antibiotique par cette souche. Elle a montré une activité contre les bactéries à Gram positif seulement mais pas contre les bactéries à Gram négatif ce qui en soi un phénomène connu (Prescott, 2007), mais ces résultats ne corrobore pas avec ce qui est cité dans la littérature pour les souches de *Streptomyces* connues pour leurs spectre d'action large (Thakur *et al.*, 2007; Valanarasu *et al.*, 2008; Duraipandiyar *et al.*, 2010).

Ces résultats sont largement inférieurs avec ceux obtenus sur le milieu ISP2 car la souche TA4 est fortement active sur ce milieu contre les bactéries à Gram positif: *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 avec des diamètres d'inhibition de 30 et 22 mm, respectivement. Donc aucune amélioration de la production des antibiotiques n'est obtenue avec la variation des sources de carbone, mais cela n'exclut pas la possibilité que cette souche produit d'autres antibiotiques différents de ceux produits sur le milieu ISP2 (cela peut être vérifié par HPLC et par les études spectrophotométriques).

L'activité antibiotique (antibactérienne) de la souche TA4 est meilleure sur le milieu ISP2 (riche en extrait de malt 10g/l) que sur d'autres milieux utilisés pour cette étude (exempte d'extrait de malt), il est donc évident que les composants de l'extrait de malt aient joué un rôle important dans l'augmentation de cette activité sur milieu ISP2. Il se pourrait aussi que la grande quantité des sucres dans le milieu de base (10 g/l) ait joué un rôle néfaste. En effet, selon plusieurs auteurs, tels que Kominek (1972), Hurley et Bialek (1974) et Kennel et Demain (1978), Kimura (1980), pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, le glucose, source de carbone rapidement assimilable (utilisé pendant le métabolite primaire), exerce à une certaine concentration une répression catabolique sur la production d'antibiotiques tels que l'actinomycine, la bacitracine, la céphalosporine

C, le chloramphénicol, la kanamycine, la pénicilline, etc. Pour une concentration de 10 g/l de glucose, Zitouni (2005) a montré un effet répressif de ce sucre sur la production d'antibiotiques nucléosidiques, mais pas sur les macrolides.

Par ailleurs, nos résultats montrent que des activités antibactériennes moins importantes mais relativement appréciables ont été obtenues en utilisant le D-tréhalose (11 et 17 mm contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c respectivement) et le fructose (5 et 11 contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c respectivement), ce qui concorde avec les résultats obtenus par Islam *et al.* (2009). Certains travaux rapportent en effet, que la biosynthèse de l'activité antimicrobienne est meilleure en présence de fructose, tel que la production d'oléandomycine par *Streptomyces antibioticus* (Vilches *et al.*, 1990), d'actinomycine -D par *S. halstedii* (Praveen *et al.*, 2008), de néomycine par *S. fradiae* NCIM2418 (Vastrad *et al.*, 2011). En contre partie, d'autres travaux rapportent une réduction ou même une absence de production en présence du fructose (Thakur *et al.*, 2009 ; Gunda *et al.*, 2013).

Les différentes sources de carbone sont communément utilisées comme substrats de croissance pour produire par fermentation, des antibiotiques, des enzymes et d'autres métabolites secondaires. Cependant, cette production peut être parfois limitée en raison de l'effet négatif exercé par certaines d'entre elles (Sanchez et Demain, 2002). La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure avec une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon) (Lebrihi *et al.*, 1988; Lounès *et al.*, 1995), que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose. En effet, pour la plupart des microorganismes producteurs, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la production (Martin and Demain, 1980; Larpent et Sanglier, 1989). Dans ce cas, la production des antibiotiques commence après que la source de carbone favorisant une croissance rapide soit entièrement métabolisée. En revanche, le glucose peut s'avérer être la meilleure source de carbone pour la production d'antibiotiques. C'est le cas des dithiopyrrolones produites par *Saccharothrix algeriensis* (Lamari, 2006).

L'ISP2 a été en général le meilleur milieu de culture pour la production d'antibiotiques, comme l'ont souligné Badji (2006) et Boudjella (2007), qui ont testé presque une dizaine de milieux à cet effet.

Les expériences de la production des antibiotiques de la souche TA4 ont été effectuée sur milieu ISP2 liquide (à base d'extrait de levure, d'extrait de malt et de glucose) en raison des résultats d'activité satisfaisants obtenus par cette souche sur ce milieu lors des testes d'antagonismes par rapport au autre milieu utilisés lors de l'étude de l'effet de sources de carbone sur l'activité antibiotique de la

même souche. L'évolution de l'activité antimicrobienne est testée contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c pendant 10 jours d'incubation.

Une diminution de l'activité a été notée pour les extraits organiques par rapport au filtrat de culture. Cette diminution des activités est probablement due à la nature hydrophile des antibiotiques produits par la souche TA4 à partir de 5<sup>ème</sup> jour et qui ne sont pas extractible par des solvants peu ou moyennement polaires.

Le choix du meilleur solvant d'extraction de l'activité antibiotique repose sur deux paramètres:

- Le solvant doit extraire une bonne activité antimicrobienne.
- Le solvant doit extraire le moins d'impuretés possibles, comme c'est le cas pour le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle (connu pour cette propriété) comme l'ont souligné Zitouni (2005) et Lamari (2006) et ceci s'est confirmé dans notre cas, contrairement par exemple *n*-butanol (Badji, 2006), et ce, pour faciliter le processus de purification par HPLC. De ce fait, l'acétate d'éthyle a été retenu comme meilleur solvant d'extraction du filtrat de culture de la souche TA4. Ce solvant est connu pour son pouvoir d'extraction élevé.

Les deux cinétiques confirment que le cinquième jour est le jour optimal de production des antibiotiques par la souche TA4. Ce temps d'incubations est souvent rapporté dans la littérature comme temps nécessaire pour la production des antibiotiques et il correspond dans la majorité des cas à au début de la phase de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

L'analyse par HPLC de l'extrait à l'acétate d'éthyle au 5<sup>ème</sup> jour d'incubation de la culture de la souche TA4 montre la présence de deux composés nommés A et B après 21 et 24 min d'élution respectivement ce qui confirme la nature hydrophobe de ces antibiotiques.

Le spectre UV-visible montre des maxima d'absorption entre 270 et 280 nm ce qui suggère la présence de produits aromatiques ou hétérocycliques.

Les espèces les plus proche de la souche TA4 sont connues pour la production de plusieurs antibiotiques comme l'elloramycine produit par *S. olivaceus* (Drautz et al., 1985) et la pactamycine produite par *S. pactum* (Bhuyan, 1962).

L'elloramycine est un médicament antitumoral (qui possède une structure proche des anthracyclines), un nouveau antibiotique produit par *Streptomyces olivaceus*, actif contre une variété des bactéries à Gram positive spécialement les streptomycètes et les cellules souches de la leucémie (Drautz, 1985).

Il y a plus de cinquante ans, la pactamycine a été isolée en tant qu'agent antitumoral potentiel. Il a été réalisé plus tard qu'il s'agissait en fait d'un agent antibactérien capable d'inhiber la synthèse de protéines lors de procédé de traduction. Récemment, il a même été démontré que certains de ses analogues possèdent des propriétés antiprotozoaires prometteuses (Dorich, 2013).

### Conclusion et perspectives

L'actinobacteriologie marines est devenue récemment un axe de recherche très important et très émergent dans le monde entier, cela est prouvé par la richesse, la biodiversité des milieux marins en actinobactéries et leur potentiels de production de nouveaux métabolites bioactifs signalé par plusieurs chercheurs. Ces travaux ont aboutis à la mise en évidence d'un nombre infini d'actinobactéries appartenant à des genres fréquents comme *Streptomyces*, ou peu fréquents tels que *Saccharothrix*, *Nocardiopsis*, *Planomonospora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura* etc., et aussi, à la découverte de nouvelles espèces et la description de plusieurs nouvelles molécules bioactives.

Le présent travail a comme objectif la recherche d'actinobactéries dans le milieu marin, la possibilité de la mise en évidence de nouvelles espèces, ainsi que l'étude du potentiel antagoniste des souches isolées à produire des molécules bioactives.

Notre étude a été réalisée sur 6 échantillons provenant de 3 différentes côtes d'Algérie (Cherchelle, Gouraya, Tipaza). L'isolement des actinobactéries sur le milieu "chitine vitamines agar" supplémenté d'agents sélectifs a permis d'obtenir 19 isolats.

La caractérisation morphologique préliminaire des isolats a permis de rattacher d'une manière présomptive 13 isolats au genre *Streptomyces*, 5 isolats au genre *Nocardiopsis* ou *Saccharothrix* et 1 seul isolat au genre *Rhodococcus*.

L'étude du pouvoir antagoniste des souches d'actinobactéries isolées a été effectuée par la méthode des cylindres d'agar, basée sur la mise en évidence de l'activité antibiotique des souches sur le milieu ISP2 semi solide contre plusieurs germes-cibles.

Les résultats de cette méthode ont révélé un potentiel important des souches à produire des molécules bioactives. En effet sur les 19 souches d'actinobactéries testés, 16 se sont montrées actives contre au moins un germe-cible. En revanche, 3 souches n'ont présenté aucune activité (TB1, CA5 et TBF1).

Il est intéressant de noter que toutes les souches de *Nocardiopsis* / *Saccharothrix* présentent des activités antimicrobiennes. Ensuite viennent les souches appartenant au genre *Streptomyces* avec 84,6% des souches actives. Cependant, l'unique isolat de *Rhodococcus* (TB1) n'a montré aucune activité.

Cette étude a révélée qu'une souche (TA4) possède une forte activité contre deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* 639c résistante à la méticilline et *Bacillus*

*subtilis* ATCC 6633) sur le milieu ISP2 et moins importante sur 20 autres milieux synthétiques contenant des sources de carbones divers.

Une approche polyphasique: morphologique, physiologique et moléculaire (séquençage de l'ADN ribosomique 16S avec une étude phylogénétique approfondie) a été consacrée pour la souche la plus active sur le plans antagoniste, ce qui nous a permis de la rapproché des espèces de *Streptomyces olivaceus* et *S. pactum* avec un pourcentage de similarité égale à 99,79 %.

La cinétique de la production des antibactériens par la souche TA4 par les méthodes de diffusion des puits et diffusion des disques de papier suivi par des analyses par HPLC et détermination de longueurs d'ondes d'absorbance maximales ont montré que cette souche est capable de produire deux antibiotiques de nature aromatiques au cinquième jour d'incubation extractible par l'acétate d'éthyle.

Notre travail confirme une autre fois que le milieu marin est une source prometteuse d'actinobactéries de point de vu diversité et activité antimicrobienne. L'exploitation de ce potentiel pourrait répondre au besoin accru des antibiotiques surtout contres MRSA.

Le travail effectué ouvre des perspectives multiples qui concernent:

- L'étude moléculaire des souches d'actinobactéries isolées.
- La détermination de l'espèce de la souche TA4 par la réalisation des hybridationsADN-ADN avec les espèces les plus proches.
- La purification des anbtibactériens produits par la souche TA4 et la détermination de leur structure chimique par spectrophotométrie infra-rouge et surtout par RMN (la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13)
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).
- La recherche des activités biologiques autre qu'antibiotique des souches actives telles que les activités antitumorales et antiparasitaires.

## Références bibliographiques

- Alexander M. (1971). - Microbial Ecology. John Wiley and Sons, Inc., New York. 511 p.
- Al-Zarban S.S., Al-Musallam A.A., Abbas I., Stackebrandt E., Kioppenstedt R.M. (2002). - *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int J Sys EnvMicrobiol*, 52: 555-558.
- Anisha GS et Prema P. (2006). - Selection of optical growth medium for the synthesis of  $\alpha$ -galactosidase from mangrove actinomycetes. *Indian J Biotech*, 5:376–379
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., et Lebrihi A.. (2012) Activit e antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxinog enes r esistants aux antibiotiques. *Journal de Mycologie Médicale* 22: 42-51.
- Arai T et Mikami Y. (1972). - Chromogenecity of *Streptomyces* Appl. *Microbiol*, 23: 402-406.
- Ayuso-Sacido A et Genilloud O. (2005). - New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol*, 49: 10-24.
- Aszalos A. (1986). - Modern analysis of antibiotics. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Vol. 27. Ed, Marcel Dekker, Inc.
- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985). -Numerical classification of Actinomadura and Nocardiopsis. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 35: 86-98.
- Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2006). - Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, 52: 373-382.
- Baldacci, E. (1962). -Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann. Soc. Belge. M d. Trop.*, 4 : 633–646.
- Barcina I., Iriberry J. and Egea L. (1987). -Enumeration, isolation and some physiological properties of actinomycetes from sea water and sediment. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 85-91.
- 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. Microbiol.*, 13: 236-242.
- Bernan V.S., Montenegro D.A., Maiese W.M., Steinberg DA and Greenstein M. (1994). - Bioxalomycins, new antibiotics produced by the marine *Streptomyces* sp. LL-31F508: taxonomy and fermentation. *J Antibiot* , 47:1417–1424.
- Belghit S., Driche EH., Bijani C., Zitouni A., Sabaou N., Mathieu F.(sous press). Activit e of 2,4-Di-tert-butylphenolproduces by streptomyces mutabilis isolated from a saharien soil against Candida albicans and other pathogenic fugi.J.Mycol. Med
- Bhuyan B. K. (1962). -Pactamycin Production by *Streptomyces pactum*. *Applied microbiology.*, 10:302–304.
- Boudjella H. (1994). - Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons   la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177 p.
- Bouras N, Meklat A, Toumatia O, Mokrane S , D. Holtz M, E. Strelkov S and Sabaou N. (2013) Bioactive potential of a new strain of Streptomyces sp. PP14 isolated from Canadian soil. *Afrecaïn journal of microbiology research*.7(23): 3199-3208
- Boudjella H. (2007). - Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger. 188 p.

- Bull A.T., Ward A.C. and Goodfellow M. (2000). -Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:573–606.
- Boucheffa K. (2011). - Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. These de Magister En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université Abderrahmane Mira, Bejaia. 90p
- Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2005). - Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebka de Ain Mlila. *Sciences & TechnologieC* ., 23 : 5–10.
- Borelli D., Middelveen M. (1986). -Actinomycetoma caused by *Streptomyces somaliensis*. *ArchDermatol.*, 122: 1097–1098.
- Biabani M.A., Laatsch H., Helmke E &Weyland H. (1997). -Delta-Indomycinone: a new member of pluramycin class of antibiotics isolated from marine *Streptomyces* sp. *J Antibiot.*, 50:874–877.
- Buchanan G.O., Williams P.G., Feling R.H., Kauffman C.A., Jensen P.R. & Fenical W. (2005). Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinisporatropica*. *Org Lett.*, 7:2731–2734.
- Butler M.J. and Day A.W. (1998). -Fungalmelanins: a review. *Can. J. Microbiol*, 44: 1115–1136.
- Berdy J. (2005). - Bioactive microbial metabolites. *J.Antibiot.*, 58:1–26.
- Berdy J., Aaszalos A., McNitt K.L. (1987). -CRC Handbook of antibiotic compounds. Microbial metabolites. vol 13. Parties 1, 2, 3. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1072 p.
- Bouras N. (2005). - Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 121 p.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (1994) Holt JH, Kreig NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (Eds). 9ème édition, Williams and Wilkins Co., Baltimore. 816 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2004) Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG (Eds). vol 4: Taxonomic Outline of the Prokaryotes. 2ème edition, Springer-Verlag, New York. 401 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2012). Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York. 1750 p.
- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E. and Lechevalier H.A. (1964). -Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 12: 421-423.
- Capon R.J., Skene C., Lacey E., Gill J.H., Wicker J., Heiland K. & Friedel T. (2000). -Lorneamides A and B: two new aromatic amides from a southern Australian marine actinomycete. *J. Nat. Prod.*, 63:1682–1683
- Chandramohan D., Loka Bharathi P. A., Nair S. and Matondkar S. G. P. (1986). -Bacteriology of ferromanganese nodules from the Indian Ocean. *Geomicrobiol. J.* 5: 17-31.
- Charan R.D., Schlingmann G., Janso J., Bernan V., Feng X. & Carter G.T. (2004). - Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.* 67: 1431–1433.
- Chater, K. (1999). -David Hopwood and the emergence of *Streptomyces* genetics. *Int.Microbiol.*, 2(2): 61–68.
- Chen Y. G., Wang Y. X., Zhang Y. Q., Tang S. K., Liu Z. X., Xiao H. D., Xu L. H., Cui X. L. and Li W. J. (2009). - *Nocardiosis litoralis* sp. nov., a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59: 2708-2713.
- Collins M.D., Goodfellow M. and Minnikin D.E. (1980). - Fatty acid, isoprenoidquinone and polar lipid composition in the classification of *Curtobacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.*, 118: 29-37.

- Collins M.D. and Jones D. (1981). -Distribution of isoprenoid quinone structural type in bacteria and their taxonomic amplification. *Microbiol. Rev.*, 45: 316-354.
- Collins M. D. (1985). - Isoprenoid quinone analysis in bacterial classification and identification. In: Chemical methods in bacterial systematic. Goodfellow M. and Minnikin D. E. (Eds). Society for Applied Bacteriology, Technical Series no. 20. Academic press. London. pp. 267-287.
- Cook A.E. and Meyers P.R. (2003). - Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S-rRNA gene restriction fragment patterns. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1907-1915.
- Coombs J.T., and Franco. (2003). -Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilised wheat roots. *Ame. Soc. Microbiol.*, 69 (9): 5603-5608.
- Colwell R.R. & Hill R.T. (1992). -Microbial diversity. In: Diversity of Oceanic Life: An Evaluative Review (Peterson MNA ed). The Centre for Strategic and International Studies, Washington, DC, pp 100–106.
- Das S., Lyla P.S. & Khan S.A. (2006). -Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Curr. Sci.*, 90:1325–1335.
- Dastager S.G., Li W.J., Dayanand A., Tang S.K., Tian, X.P., Zhi X.Y., Xu, L.H. and Jiang C.L. (2006). - Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *Afr. J. Biotechnol.*, 5 (8): 1131–1134.
- De Carvalho C.C.C.R. and Pedro F. (2010). Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Mar. Drugs.*, 8:705–727.
- Demain A. L., Kennel Y. M., Aharonowitz Y. (1979). - Carbon catabolite regulation of secondary metabolism. pp. 163-185. In: Microbial technology; current state, future prospects, 29th Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press Cambridge.
- Demain A.L. and Salomon N.A. (1986). -Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology Press, Washington.
- Dolak L. A., Castle T.M. and Laborde A. L. (1980). - 3-Trehalosamine, a new disaccharide antibiotic. *J. Antibiot.*, 33: 690-694.
- Dommergues Y. et Mangenot F. (1970). - Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.) Paris.
- Donadio S., Sosio M., Lancini G. (2002). -Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60(4) : 377–80.
- Drautz H., (1985). -Metabolic products of microorganisms. *J. Antibiot.*, 38(10):1291–1301.
- Duetz W. A. and Witholt B. (2001). - Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square deepwell microtiter plates. *Biochem. Eng. J.*, 7: 113-115.
- Duraipandiyar V., Sasi A.H., Islam V.I.H., Valanarasu M. and Ignacimuthu S. (2010). - Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *J. Mycol. Med.*, 20:15–20.
- Ellaiah P. and Reddy A. P. C. (1987). -Isolation of actinomycetes from marine sediments off Visakhapatnam, east coast of India. *Indian. J. Mar. Sci.*, 16: 134-135.
- Elwan S.H., Dab A. and Al-Gounaim Y. (1985). -Ecology of the *Streptomyces* flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6: 99-104.
- Ensign J.C., Normand p., Burden J.P. and Yallop C.A. (1993). -Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.*, 144: 657-660.
- Felsenstein J. (1985). -Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783–791.
- Fischer A., Kroppenstedt R. M. and Stackebrandt E. (1983). - Molecular genetic and chemotaxonomic studies on *Actinomadura* and *Nocardiopsis*. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 3433-3446.
- Gazenko S.V., Reponen T.A., Grinshpun S.A., Willeke K. (1998). -Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(11): 4410–4415.

- Genilloud O., González I., Salazar O., Martín J., Tormo J. R. and Vicente F. (2011). - Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 375- 389.
- Ghanem N.B., Sabry S.A, El-Sherif Z.M., Abu El-Elal G.A. (2000). -Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen.Appl.Microbiol.*, 46(3):105–111.
- Gontang E. A., Gaudêncio S. P., Fenical W. and Jensen P. R. (2010). - Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine Actinobacteria. *Appl. Env. Microbiol.*, 76: 2487-2499.
- Goodfellow M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 69 : 33-90.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). -Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37:189– 216.
- Goodfellow M. and Hayenes J. A. (1984). -Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz, L., L. F. Bojalil and V. Yakoleff eds. *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Academic Press, New York, London, p.453-472.
- Goodfellow M., Mordarski M. and Williams S. T. (1988). - The biology of the actinomycetes. Academic Press, London. pp. 7-164.
- Goodfellow M., Stalon L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E. (1990). Numerical and chemical classification of Actinoplanes and some related actinomycetes. *Journal of General Microbiology*, 136, 19–36.
- Gordon R. E., Barnett D. A., Handarhan J. E. and Hor-Nay-Pang C. (1974). - Nocardia coeliaca, Nocardia autotrophica and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 54-63.
- Grein A. and Meyers S. P. (1958). -Growth characteristic and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and material suspended in seawater. *J. Bacteriol.*,76: 457-463.
- Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 5-11.
- Gunda M. M. and Charya M.A. S. (2013). - Physiological factors influencing the production of antibacterial substance by fresh water Actinobacteria. *J. Recent. Advances. Applied Sciences.*, 28: 55-62.
- Hayakawa M., and Nonomura H. (1987). - Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.*, 65: 501-509.
- Hermans L., Gossele F. et Biot A. (1989). - Fermentations industrielles. In: *Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent J. P. and Sanglier J. J. (Eds). Masson. Paris. pp.342-380.
- Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K.D., Mengu M., Jakobsen M., et al. (2002) - Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone. *PCT Int Appl* 19:140– 150.
- Hopwood D.A. (1973). -Genetics of the Actinomycetales. *Soc.Appl.Bacteriol.SympSer.*, 2: 131–53
- Hopwood D.A. (2003). -Streptomyces genes: from Waksman to Sanger. *J. Ind.Microbiol.Biotechnol.*, 30(8): 468–471.
- Hurley L.H. and Bialek D. (1974). - Regulation of antibiotic production: catabolite inhibition and the dualistic effect of glucose on indolmycin production. *J. Antibiot.*, 27: 49-56.
- Imada C., Koseki N., Kamata M., Kobayashi T., and Hamada-Sato N. (2007). Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*, 21 (1): 27-31.
- Ishizawa S. and Araragi M. (1976). Composition of actinomycetes population in soil. In: *Actinomycetes, the boundary microorganisms*. Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107.
- Islam M R., Jeong Y T., Ryu Y J., Song C.H.and Lee Y. S. (2009). - Isolation, Identification and Optimal Culture Conditions of Streptomyces albidoflavus C247 Producing Antifungal Agents against Rhizoctonia solani AG2-2. *Mycobiol.*, 37:114-120.
- Jensen P.R., Dwight R., Fenical W. (1991). -Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(4):1102–1108.
- Jensen P.R. and Fenical W. (1996). -Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 17:346–351.

- Jeong S.Y., Shin H.J., Kim T.S., Lee H.S., Park S.K. and Kim H.M. (2006). -Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. *J Antibiot* (Tokyo) 59:234–240
- Jukes T.H. and Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, pp 21–132
- 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.
- Kennel Y.M. and Demain A.L. (1978). - Effect of carbon on  $\beta$ -lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acremonium*. *Exp. Mycol.*, 2, 234-238.
- Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S. and Chun J. (2012). -Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence data- base with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:716–721.
- Kim M., Oh H.S., Park S.C. and Chun J. (2014). -Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16SrRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:346–351.
- Kroppenstedt R. M. (1985). - Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Goodfellow M. and Minnikin D. E (Eds). Academic Press. London. pp. 173-199.
- Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. and Goodfellow M. (1990). - Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 13: 148-160.
- Kimura M. (1980). - A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16:111-120.
- 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. *J Med Mycol*, 15(1) : 45–51.
- Kominek L.A. (1972). - Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1, 123-124.
- Krassilnikov N. A. (1938). *Microbiologia* (U.S.S.R.), 7, 335.
- Kundu S., Sahu M.K., Sivakumar K. and Kannan L. (2006a) -Occurrence of antagonistically active extracellular enzyme producing actinomycetes in the alimentary canal of estuarine fishes. *Asian JrMicrobiol Biotech Envi Sc.*, 8: 707–710.

## L

- Labeda D. P. and Lechevalier M. P. (1989). - Amendment of the genus *Saccharothrix* Labeda *et al.* 1984 and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 420-423.
- 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.
- Labeda D.P., Hatano K., Kroppenstedt R.M., and Tamura T. (2001). -Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, 51:1045- 1050.
- Lacey, J. (1973). -Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Eds.: G. Sykes, F.A. Skinner. Academic press, London, New York. 231–251.
- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F. (2002). - New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, 55, 696-701.

- Lamari L. (2006). - Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Faculte des sciences biologiques et agronomiques. Tizi ouzou.176 p.
- Lang S., Beli W., Tokuda H, Wicke C. and Lurtz V. (2004). -Improved production of bioactive glycosylmannosyl-glycerolipid by sponge-associated Microbacterium species. *Mar Biotech* 6:152–156
- Larpent, J.-P., Larpent-Gourgaud, M. (1985). -Éléments de Microbiologie. Hermann. Paris. 264 p.
- Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Ed. Masson. Paris, 481p.
- Lazzarini, A., Cavaletti L., Toppo G., and Marinelli F. (2000) -Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78: 399–405.
- Lebrihi A., Lefebvre G. and Germain P. (1988). - Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 44-51.
- Lechevalier H. A. (1964). -The actinomycetes. In: Henkelekan, H. and N. C. Dondero eds. *Principles and Application in Aquatic Microbiology*. John Wiley, New York, p.230-253.
- Lechevalier H. A. and Lechevalier M. P. (1967). -Biology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 21: 71-100.
- Lechevalier M. P. and Lechevalier H. A. (1970a). - Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.) G. Fisher Verlag, Jena, 311-316.
- Lechevalier M. P., de bièvre C. and Lechevalier H. A. (1977). - Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5: 249-260.
- Lechevalier H. A., Lechevalier M.P. (1981). -Introduction to the order Actinomycetales. In: *The prokaryotes*, Vol. 2 (Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds.), Springer – Verlag, Berlin. p. 1915–1922.
- Le Minor L., Veron M. (1989). -*Bacteriologiemedicale*. 2èmeédition. Medecine. Sciences Flammarion.
- Li W. J., Tang S. K., Stackebrandt E., Kroppenstedt R. M., Schumann P., Xu L. H. and Jiang C. L. (2003). - *Saccharomonospora paurometabolica* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from soil in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1591-1594.
- Lieske R. (1921). *Morphologie und Biologie der Strahlenpilze*, Lipsia
- Liu D., Coloe S., Baird R. and Pedersen J. (2000). - Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 471.
- Locci R. 1989. *Streptomyces* and related genera. In: *Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Company. 4: 2451-2508
- Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. and Germain P. (1995). - Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.*, 31, 304-311.
- Li F., Maskev R.P., Qin S., Sattler I, Fiebig HH, Maier A, ZeeckA and Laatsch H. (2005) Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolated M045. *J Nat Prod* 68:349–353
- Lin W.P., Lai H.L., Liu Y.L., Chiung Y.M., Shiao C.Y., Han J.M., Yang C.M., and Liu,Y.T. (2005). -Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 38, 320–326.
- Lindholm P., Kortemaa H., Kokkola M., Haahtela K., Salkinoja-Salonen, M., Valkonen, J.P.T. (1997). - *Streptomyces* spp. Isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Dis*, 81(11): 1317–1322.
- Liu R., Cui CB., Duan L., Gu QQ and Zhu W.M. (2005). -Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecyprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. *Arc Pharm Res* 28:1641–1344
- Liu W., Ahlert J., Gao Q., Wendt-Pienkowski E., Shen B. and Thorson J. S. (2003). - Rapid PCR amplification of minimal enediynepolyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100: 11959-11963.

- Macherla VR., Liu J., Bellows C., Teisan S., Lam KS., Potts BCM. (2005). -Glaciapyrroles A, B and C, pyrrolsesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod* 68:780–783
- Manam RR., Teisan S., White DJ., Nicholson B., Grodberg J., Neuteboom ST., Lam KS., Mosca DA., Lloyd GK and Potts BC. (2005). -Lajollamycin, a nitro-tetraenespiro-beta-lactone-gamma-lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. *J Nat Prod* 68:240–243
- Marchal N. et Bourdon J. L. (1973). - Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds). Paris. 179 p.
- Marchal N., Bourdon J.L. et Richard C.L. (1987). -Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin Press, Paris.
- Mariat, F., Sebald M. (1990). -Les actinomycetes. Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- Martin J.F. and Demain A.L. (1980). - Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 44, 230-251.
- Maskey RP., Helmke E. and Laatsch H. (2003) Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycintype antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. *J Antibiot* 56:942–949
- Maskey RP., Helmke E., Fiebig HH. and Laatsch H. (2002). -Parimycin: isolation and structure elucidation of a novel cytotoxic 2,3-dihydroquinizarin analogue of gamma-indomycinone from a marine streptomycete isolate. *J Antibiot* 55: 1031–1035
- Maskey RP., Sevvana M., Uson I., Helmke E., Laatsch H. (2004) Gutingimycin: a highly complex metabolite from a marine streptomycete. *Angew Chem Int Ed Engl* 43:1281–1283
- Maskey RP., Halmke E., Kayser O., Fiebig HH., Maier A., Busche A and Laatsch H. (2004). -Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with anti-malaria activity from a marine Streptomycete and their absolute stereochemistry. *J Nat Prod* 57:771–779
- Meklat *et al*, 2012)
- Meiyong Z. and Zhicheng Z. (1998) Identification of marine actinomycetes S-216 strain and its biosynthetic conditions of antifungal antibiotic. *J Xiamen Univ Nat Sci* 37:109–114
- Metsä-Ketelä M., Salo V., Halo L., Hautala A., Hakala J., Mäntsälä P. and Ylihonko K. (1999). - An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 180: 1-6.
- Mincer T.J., Jensen P.R., Kauffman C.A. and Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5005–5011.
- Minnikin D.E., Patel P.V., Alshamaony L. and Goodfellow M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 104-117.
- Moncheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska. N. (2002). Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *J of Culture Collections*, 3 (1), 3-14.
- Mordarska H., Mordarski M. and Goodfellow M. (1972). Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 71:77-86.
- Murugan M., Srinivasan M., Sivakumar K., Sahu MK and Kannan L. (2007) Characterization of an actinomycete isolated from the estuarine fish, *Mugilcephalus* Lin. (1758) and its optimization for cellulase production. *J SciInd Res India* 6: 388–393
- Nakamura H., Itaka H, Kitahara T., Okazaki T. et Okami Y. (1977) Structure of aplasmomycin. *J Antibio* 30:714–717.

- Nagai A., Khan S. T., Tamura T., Takagi M. and Shin-ya K. (2011). *Streptomyces aomiensis* sp. nov., a novel species of *Streptomyces* isolated from a soil sample using the membrane filter method. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61: 947-950
- Nolan R. D. and Cross T. (1988). - Isolation and screening of actinomycetes, In: *Actinomycetes in biotechnology*. Goodfellow M., Williams S. T. and Mordarski M. (Eds). Academic Press, Inc., San Diego, Calif. pp. 1-32.
- Ochi K., Haraguchi K. and Miyadoh S. (1993). - A taxonomic review of the genus *Microbispora* by analysis of ribosomal protein AT-L30. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 58-62.
- Okami Y. and Hotta K. (1988). - Search and discovery of antibiotics. In: *Actinomycetes in biotechnology*. Goodfellow M., Williams S. T. and Mordarski M. (Eds.) London. Academic Press. pp. 33-67.
- Okazaki, T. and Y. Okami. (1975). -Actinomycetes tolerant to increased NaCl concentration and their metabolites. *J. Ferment. Technol.* 53: 833-840.
- Omura S. (1992). Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. ind. Microbiol.* 10:135–156.
- Pathom-aree W., Ward A. C., Horikoshi K., Bull A. T., Goodfellow M. (2006). - Diversity of actinomycetes isolated from the Challenger Deep sediment (10898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10: 181-189.
- Peczynska-Czoch W. and Mordarski H. (1988). – Actinomycetes enzymes. In: *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (Eds.). Academic Press, London, pp. 219-283.
- Porter J.N. (1971). -Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes. *AdvApplMicrobiol*, 14: 73–92.
- Prave P., Faust W., Sitting W. and Sukatsch DA. (1987). -Fundamentals of Biotechnology VCH; Verlagsgesellschaft. Mbh. D. 6940. Weinheim. FRG
- Praveen V., Tripathi C.K.M. and Bihari V. (2008). - Studies on optimum fermentation conditions for actinomycin-D production by two new strains of *Streptomyces* spp. *Med. Chem. Res.*, 17, 114–122.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M., Dusart J. (2002). - *Microbiologie*. De Boeck Université, pp.1147.
- Prescott LM., Harley JP., Klein DA. (2007). -*Microbiologie*. De Boek and Larcier, Bruxelles. pp. 805–825.
- Pridham T.G., Hesseltine C.W. and Benedict R.G. (1958). A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups: placement of strains in morphological selection. *Appl. Microbiol.*, 6 : 5-79.
- Rainey F. A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R. M. and Stackebrandt E. (1996). - The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 1088-1092.
- Rapilly F. (1968). - Techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyties*, 19. Numéro hors série.
- Räty K., Kantola A., Hakala J., Ylihonko K. and Mantsala P. (2002). – Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeusaclacinomycinspolyketide* synthase (PKS) cluster. *Gene*, 293, 115-122.
- Reponen, T.A., Gazonko, S.V., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Cole, E.C. (1998). Characteristics of Airborne Actinomycete Spores. *Appl Environ Microbiol* 64 (10): 3807–3812.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et Germain P. (1998). - Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, 9: 147-153.
- Sahu MK, Sivakumar K. and Kannan L. (2007a) Alkaline protease production by an actinomycetes isolated from tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). *Natl Acad Sci Lett* 30:61–65
- Sahu MK, Sivakumar K, Poorani E, Thangaradjou T and Kannan L. (2007a) Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. *J Environ Biol* 28:465–474

- Sahu MK, Poorani E, Sivakumar K, Thangaradjou T and Kannan L. (2007b) Partial purification and anti-leukemic activity of L-asparaginase of the actinomycete strain LA-29 isolated from an estuarine fish, *Mugilcephalus* (Linnaeus, 1758). *J Environ Biol* 28 (3):645–650
- Sanglier J.J. Haang H., Huck T.A. and Fehr T. (1993). – Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, 144, 633-642.
- Sanchez L.J.M., Martinez I.M., Perez BJ., Fernandez PJL., Canedo HLM (2003) New Cytotoxic indolic metabolites from a marine Streptomyces. *J Nat Prod* 66:863–864
- Sanchez S. et Demain A.L. (2002). - Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzy. Microb. Technol.*, 31:895-906.
- Sarkonen N., Könönen O., Summanen P., Kanervo A., Takala A., et Jousimies-Somer H., (2000). Oral Colonization with Actinomyces Species in Infants by Two Years of Age. *J Dent Res.* 79: 864-867.
- Shirling B. and Gottlieb D. (1966). - Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16: 3313-3340.
- Sierra G. (1957). - A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Leeuwenhoek*, 23: 15-22.
- SivaKumar, K., (2001). Actinomycetes of an Indian mangrove (Pichavaram) environment: An inventory, Ph.D. thesis, Annamalai University, 91p.
- Sivakumar K., Sahu MK., Manivel P. R. and Kannan L. (2006) Studies on L-glutaminase producing actinomycetes strain LG-10 from the estuarine fish, *Chanoschanos* (Forsk., 1775). *Indian J Exp Biol* 44:256–258
- Sivakumar K., Kumar Sahu M., Thangaradjou T. and Kannan L. (2007). Research on marine actinobacteria in India. *Indian J. Microbiol.* 47:186–196.
- Sneath P.H.A. (1989). Numerical taxonomy. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 2303-2305.
- Solans M., Vobis G., Cassan F., Luna V. and Wall L.G. (2011). -Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant *Ochetophilatrinervis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 2195-2202.
- Solanki R., Khanna M. and Lal R. (2008). - Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Ind. J. Microbiol.*, 48: 410-431.
- Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A. (2012). -Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol* 7:373–390.
- Soria-Mercado IE., Prieto-Davo A., Jensen PR and Fenical W. (2005). -Antibiotic terpenoidchlorodihydroquinones from a new marine actinomycete. *J Nat Prod* 68:904–910
- Sponga F., Cavaletti L., Lazzarini A., Borghi A., Ciciliato I., Losi D., and Marinelli F., (1999). Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *J. Biotechnol.* 70: 65-69.
- Stach J.E., Maldonado L.A., Masson D.G., Ward A.C., Goodfellow M. and Bull A.T. (2003). Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6189–6200.
- Stackebrandt E. and Woese C.R (1981). The evolution of procaryotes. *Synopsia of the society for general microbiology*, 32, 1-31.
- Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M. and Fowler V.J. (1983). A phylogenetic analysis of the family Dermatophilaceae. *J. Gen. Microbiol.*, 129 (6), 1831-1838.

- Stackebrandt E., Kroppenstedt R. M., Jahnke K. D., Kemmerling C. and Gürtler H. (1994). - Transfer of *Streptosporangium viridogriseum* (Okuda et al., 1966), *Streptosporangium viridogriseum* subsp. *Kofuense* (Nonomura and Ohara 1969), and *Streptosporangium albidum* (Furumai et al., 1968) to *Kutzneria* gen. nov. as *Kutzneria viridogrisea* comb. nov., *Kutzneria kofuense* comb. nov., and *Kutzneria albida* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Streptosporangium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 (2): 265-269.
- Stackebrandt E., Rainey F.A and Ward-Rainey N.L. (1997). A proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* clasis nov. *Int. J. syst. Bacteriol.*, 47, 479-491.
- Stackebrandt E., and Schumann P. (2006). -Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. *Prokaryotes*, 3, 297– 321.
- Stritzke K., Schulz S., Laatsch H., Helmke E and Beil W. (2004). -Novel caprolactones from a marine streptomycete. *J Nat Prod* 67:395–401
- Sun H. H., White C. B., Dedinas J., Cooper R. and Sedlock D. M. (1991). - Methylpendolmycin, an indolactam from a *Nocardiosis* sp. *J. Nat. Prod.*, 54: 1440-1443.
- Suzuki K., Sato T., Moriok M., Nagal K., Abe K., Yamaguchi H. And Saito T. (1991). - Tetrazomine, a new antibiotic produced by actinomycete strain: taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot*, 44:479-485.
- Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y. and Suzuki Y. (1994). -Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 8: 122–127
- Sujatha P., Raju KVVS and Ramana T. (2005). -Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res* 160: 119–126
- Takahashi Y. k., Matsumoto A., Seino A., Ueno J., Iwai Y. and Omura S. (2002). *Streptomyces avermectinius* sp. nov., an avermectin-producing strain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 2163-2168.
- Takizawa M., Hill R. T. and Colwell R. R. (1993). -Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 997-1 002.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725–9.
- Thakur D., Yadav D., Gogoi B.K. and Bora T.C. (2007). -Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Mycol. Med.* 17:242–249.
- Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N., Mazumdar S. (2009). - Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *J. Mycologie Médicale.*, 19 :161-167.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994). -CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- 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.
- Valanarasu M., Durairandiyan V., Agastian P. and Ignacimuthu S. (2009.) *In vitro* antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J. Mycol. Med.*, 19:22–28.
- Vastrad B. M., Nelagund S.E. (2011). - Optimization and production of neomycin from different agro industrial wates in solid state fermentation, *IJPSDR.*, 3, 104-111.

- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *MicrobiolMolBiol Rev*, 71(3): 495–548.
- Vilches C., Mendez C., Hardisson C., Salas J.A. (1990). - Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1447-1454.
- Waksman, S.A. (1919). -*Soil Sci*, 8: 71–215.
- Waksman, S.A. (1959). -The actinomycetes: nature, occurrence and activities. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1: 29–46.
- Waksman SA (1961) .-The Actinomycetes. Classification, identification and descriptions of genera and species. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 2: 61-292
- Walker, J. D and Colwell R. R .(1975). Factors affecting enumeration and isolation of actinomycetes from Chesapeake Bay and Southeastern Atlantic Ocean sediments. *Mar. Biol.* 30: 193-201.
- Wang Z.X., Li, S.M. and Heide, L. (2000). - Identification of the coumermycin A, biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* and biochemical SSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 3040-3048.
- Warren HB, Prokop JF, Grundy WE. (1955). Non-synthetic media for antibiotic producing actinomycetes. *Antib Chemother* 5:6–12.
- Wellington E. M. and Ul-Hassan A. (2009). - Actinobacteria. *Encyclopedia of Microbiology* (Moselio Schaechter, Ed.), pp. 26-44, Oxford: Elsevier.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. (1991). -16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173, 697-703.
- Weyland, H., (1981). -Distribution of actinomycetes on the sea floor. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1. suppl.*, 11: 185-193.
- Williams S.T., Lanning S., Wellington E.M.H. -(1984). Ecology of Actinomycetes. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Eds : M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. 481–528.
- 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.
- Weyland H., (1969). -Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature*, 223:858
- Yang R., Zhang L. P., Guo L. G., Shi N., Lu Z. and Zhang X. (2008). - *Nocardiosis valliformis* sp. nov., an alkaliphilic actinomycete isolated from alkali lake soil in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 1542-1546.
- Yoon J. H., Kim I. G., Shin Y. K. and Park Y. H. (2005). - Proposal of the genus *Thermoactinomyces* sensu stricto and three new genera, *Laceyella*, *Thermoflavimicrobium* and *Seinonella*, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 395-400
- Zaitlin, B., Watson, S.B., Ridal, J., Satchwill, T., Parkinson, D. (2003). Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res J Can*, 95 (2) : 113-118.
- Zaitlin, B., Watson, S.B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res*, 40(9): 1741–1753.
- Zhang J., Liu Z. et Goodfellow M. (2003). *Nocardia caishijiensis* sp. nov., a novel soil Actinomycete. *Inter J of Syst and Evol Microbiol.* 53 : 999–1004.
- Zhang Y. Q., Liu H. Y., Chen J., Yuan L. J., Sun W., Zhang L. X., Zhang Y. Q., Yu L. Y. and Li W. J. (2010). - Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai–Tibet plateau, China. *Antonie Leeuwenhoek*, 98: 213-223.

- Zheng, Z., W. Zeng, Y. Huang, Z. Yang, J. Li, H. Cai and W. Su, 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol. Lett.* 188: 87-91.
- Zhi X. Y., Li W. J. and Stackebrandt E. (2009). - An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59: 589-608.
- Zonova G.M. (1965) Melanoid pigments of Actinomycetes. *Mikrobiologiya*, 34, 278–283.
- Zitouni A. (2005). - Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 230 p.

## ANNEXE

## MILIEUX DE CULTURE

## I. MILIEUX D'ISOLEMENT DES ACTINOBACTERIES

## 1. Milieu "chitine - vitamines B " (Hayakawa et Nonomura, 1987)

**Chitine:** 2 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,35 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,15 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,2 g; NaCl: 200 g, CaCO<sub>3</sub>: 0,02 g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 10 mg; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 1 mg; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 1 mg; agar: 18 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH = 7,2.

Pour ce milieu, sont ajoutés:

\* **Les vitamines:** thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine-HCl, inositol, panthoténate de calcium: à raison de 0,5 mg/L et biotine: 0,25 mg/L. Les vitamines sont stérilisées par filtration (filtre de 0,22µm) puis dissoutes en solution aqueuse stérile avant d'être ajoutées aseptiquement au milieu autoclavé.

\* Une solution stérile d'un antifongique, le cycloheximide (actidione) à 50 mg/L.

## II. MILIEUX D'IDENTIFICATION DES ACTINOBACTERIES

## 1. Etude morphologique

1.1. Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International Streptomyces Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

## 1.1.1. Milieu ISP1

Extrait de levure: 3g; tryptone: 5g; agar: 15g; pH: 7,0-7,3.

## 1.1.2. Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 m; pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

1.2. Milieu Bennett (Warren *et al.*, 1955)

Glucose: 10 g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; extrait de viande: 1 g, eau distillée: 1000 mL; agar: 12 g; pH = 7,3.

### 1.3. Gélose nutritive (Waksman, 1961).

Peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; NaCl: 5 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,5.

## 2. Etude physiologique

### 2.1. Dégradation des glucides et dérivés (Gordon *et al.*, 1974)

Les glucides, stérilisés par filtration, sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1% après autoclavage.  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ : 1 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,2 g; extrait de levure: 1g, solution aqueuse de rouge de phénol (0,04%): 20 mL; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH = 7,2.

- Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinobactéries en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif) et après virage de l'indicateur coloré du rouge-rose au jaune.

### 2.2. Utilisation des acides aminés comme seules sources de carbone et d'azote

Le milieu utilisé est le même que celui employé pour la dégradation des glucides, mais sans extrait de levure et  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ .

### 2.3. Dégradation de l'adénine, de la guanine, de la tyrosine, de l'hypoxanthine et de la xanthine (Goodfellow, 1971; Gordon *et al.*, 1974 )

0,4 g de chaque composé (sauf pour la guanine: 0,2) est suspendu dans 10 mL d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 mL de gélose nutritive stérile et maintenue en surfusion à 50°C.

\* **gélose nutritive**: peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; agar: 15 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH = 7,5.

\* La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

### 2.4. Dégradation de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974)

10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 mL d'eau distillée (pH = 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 mL d'eau distillée (pH = 7,5) contenant 150 g de NaCl et 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles.

- L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

**2.5.- Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1973)**

**Composition:** 4 g de gélatine pour 100 mL de gélose nutritive contenant 150 g de NaCl.

- Le réactif de Frazier permet de mettre en évidence la dégradation de la gélatine (auréole claire autour des colonies).

**-gélose nutritive:** peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; agar: 15 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH = 7,5.

**2.6.- Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1973)**

**Composition:** 10 g d'amidon pour 100 mL de gélose nutritive contenant 150 g de NaCl. Une solution de Lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

**2.7.- Dégradation du Tween 80 (Sierra, 1957)**

**Composition:** NaNO<sub>3</sub>: 1 g; extrait de levure: 5 g; solution saline: 50 mL; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O: 0,1 g; **Tween 80:** 10mL; eau distillée: q.s.p. 1000 mL; agar: 18 g. pH = 7,2.

\* **solution saline:** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,25 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,125 g; NaCl: 150 g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,001 g; MnSO<sub>4</sub>: 0,001 g; eau distillée: q.s.p. 50 mL La dégradation du Tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

**2.8.- Dégradation de l'esculine et de l'arbutine (Marchal et Bourdon, 1987)**

Esculine (ou arbutine): 1 g; citrate de fer ammoniacal: 1 g; peptone: 10 g; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7.

La dégradation de ces 2 hétérosides se manifeste par l'apparition d'un pigment brun à noir autour des colonies.

**III. MILIEUX DE PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES****1.- Milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966)**

**Composition:** Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml. pH 7 à 7,2.

## TABLE DE MATIÈRES

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicaces</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>ملخص</b>	
<b>Introduction</b>	1
<b>Revue bibliographique</b>	3
<b>DEFENITION DES ACTINOBACTERIES</b>	3
<b>HISTORIQUE DES ACTINOBACTERIES</b>	3
<b>1. La première période (1877-1890)</b>	3
<b>2. La seconde période (1900-1940)</b>	3
<b>3. La troisième période (à partir de 1940)</b>	3
<b>4. La quatrième période (depuis 1960)</b>	4
<b>ECOLOGIE ET DISTRIBUTION DANS LA NATURE</b>	4
<b>1. Ecologie des actinobacteries</b>	4
<b>2. Distribution dans la nature</b>	4
<b>2.1. Le sol</b>	5
<b>2.2. Le milieu marin</b>	5
<b>2.3. La faune et l'homme</b>	5
<b>2.4. La flore</b>	6
<b>IMPORTANCE DES ACTINOBACTERIES MARINES</b>	6
<b>1. Rôle des actinobactéries dans le milieu marin</b>	6
<b>2. Antibiotiques et autres molécules bioactives</b>	7
<b>2.1. Les antibiotiques</b>	7
<b>2.2. Les mélanines</b>	7
<b>2.3. Les enzymes</b>	8
<b>2.4. Les composés anticancéreux</b>	8
<b>2.5. Protéines cellulaires uniques</b>	8
<b>LES ANTIBIOTIQUES</b>	9
<b>1. Classification générale des antibiotiques</b>	9
<b>2. Recherche de nouveaux antibiotiques et autres molécules bioactives</b>	10

<b>2.1. Méthodes de criblage conventionnelles</b>	10
<b>2.1.1. Isolement des actinobacteries et conditions de culture</b>	11
<b>2.1.2. Choix des microorganismes-cibles</b>	11
<b>2.1.3. Production et caractérisation des antibiotiques</b>	11
<b>2.2. Méthodes de criblage actuelles</b>	12
<b>2.2.1. Screening du potentiel génétique de production des métabolites secondaires</b>	12
<b>2.2.2. Miniaturisation de fermentation</b>	12
<b>TAXONOMIE DES ACTINOBACTERIES</b>	13
<b>1. Position taxonomique des actinobacteries</b>	13
<b>2. Critères d'identification des actinobacteries</b>	13
<b>2.1. Evolution des critères d'identification</b>	13
<b>2.1.1. La première période (s'est étendue jusqu'au début des années 1960)</b>	13
<b>2.1.2. La seconde période (à partir des années 60)</b>	13
<b>2.1.3. La troisième période (à partir des années 70)</b>	14
<b>2.1.4. La quatrième période (à partir des années 80)</b>	14
<b>2.2.1. Critères d'identification des genres</b>	14
<b>2.2.1.1. Critères morphologiques</b>	14
<b>a. Critères macromorphologiques</b>	14
<b>b. Caractères micromorphologiques</b>	14-15
<b>2.2.1.2. Critères chimiques: chimio taxonomie</b>	15
<b>a. Les acides aminés</b>	15
<b>b. Les sucres</b>	15
<b>c. Les Lipides</b>	16
<b>c.1. Les phospholipides</b>	16
<b>c.2. Les ménaquinones</b>	16
<b>c.3. Les acides mycoliques</b>	16
<b>c.4. Les acides gras</b>	17
<b>2.2.2. Critères d'identification des espèces</b>	17
<b>2.2.2.1. Critères physiologiques et taxonomie numérique</b>	17
<b>2.2.2.2. Critères moléculaires</b>	17
<b>a. Détermination du coefficient de Chargaff (pourcentage de guanine+cytosine)</b>	18
<b>b. Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S et phylogénie</b>	18

<b>c. Hybridation ADN-ADN</b>	19
<b>Matérielle et méthode</b>	20
<b>MATERIEL</b>	20
1. Echantillons de l'eau	20
2. Germes cibles	20
<b>METHODES</b>	20
1.1. Préparation des milieux d'isolement sélectifs	20
1.2. Préparation des dilutions	21
1.3. Technique d'ensemencement et incubation	21
1.4. Lecture et sélection des actinobacteries	21
1.5. Purification et conservation des actinobacteries	22
2. Caractérisation préliminaire des isolats	22
3. Criblage de l'activité antibiotique sur milieu solide	22
4. Caractérisation de la souche TA4	23
4.1. Caractérisation culturelle de la souche TA4	23
4.1.1. Sélection de la souche TA4	23
4.1.2. Caractères culturels de la souche TA4	23
4.2. Caractérisation physiologiques de la souche TA4	23
4.2.1. Utilisation des glucides et dérivés comme seules sources de carbone	23
4.2.2. Dégradation de divers composés organiques	24
4.3. Caractérisation moléculaire de la souche TA4	24
4.3.1. Extraction de l'ADN génomique	24
4.3.2. Amplification et séquençage de l'ADN ribosomique 16S	25
4.3.3. Analyse phylogénétique	25
5. Effet de source de carbone sur l'activité antibiotique de la souche TA4	25
6. Cinétique de l'activité antibactérienne, production et extraction de composés actifs de la souche TA4	25
6.1. Préparation des pré-cultures	25
6.2. Préparation des cultures	25
6.3. Prélèvement	26
6.4. Mise en évidence de l'activité de filtrat de culture (méthode de diffusion des puits)	26
6.5. Mise en évidence de l'activité extractible	26-27
6.5.1. Extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture et choix du meilleur solvant d'extraction	26
6.5.2. Méthode de diffusion des disques de papier	27
7. Purification des antibiotiques par l'HPLC	27
8. Etudes spectroscopiques et spectrométriques (Spectres UV-visible)	28
<b>Résultats et discussions</b>	29
<b>ISOLEMENT, DISTRIBUTION, ET CARACTERISATION PRELIMINAIRE DES ISOLATS</b>	29
1. Isolement des actinobacteries	29

<b>2. Sélection et distribution des isolats</b>	29
<b>3. Caractérisation préliminaire des isolats</b>	30
<b>CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DES SOUCHES D'ACTINOBACTERIES SUR MILIEU SOLIDE</b>	32
<b>DISCUSSION</b>	35
<b>CARACTERISATION DE LA SOUCHE TA4</b>	39
<b>1. Caractères cultureux de la souche TA4</b>	39
<b>2. Caractères physiologique de la souche TA4</b>	39
<b>3. Caractérisation moléculaire de l'isolat TA4</b>	40
<b>EFFET DE SOURCES DE CARBONES SUR L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE LA SOUCHE TA4</b>	41
<b>CINETIQUE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE, PRODUCTION ET EXTRACTION DES COMPOSES ACTIFS DE LA SOUCHE TA4</b>	43
<b>ANALYSE PAR HPLC ET SPECTROPHOTOMETRE UV-VISIBLE</b>	45
<b>DISCUSSION</b>	47
<b>Conclusion et perspectives</b>	51
<b>Référence bibliographiques</b>	52
<b>Annexe</b>	65

1 **Description et potentiel antagoniste d'une nouvelle souche d'actinobactérie**  
2 **isolée de la cote de Tipaza**

3

4 **Mellouk Imene<sup>1,2</sup>, Meklat Atika<sup>1,2</sup>, Nalubega Fatuma<sup>1,2</sup>, Chaabane Chaouch Fawzia<sup>2</sup>, Ait**  
5 **Yahia Ahmed<sup>1,3</sup>, Bouras Noureddine<sup>2,4</sup>, Mokrane Salim<sup>2</sup>, Mathieu Florence<sup>5</sup> et Sabaou**  
6 **Nasserdine<sup>2</sup>**

7

8 **<sup>1</sup>Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la**  
9 **Vie, Université Saad Dahleb, Blida, Algérie;**

10 **<sup>2</sup>Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de**  
11 **Kouba, Alger, Algérie;**

12 **<sup>3</sup>Laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse, Ecole**  
13 **Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie;**

14 **<sup>4</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre,**  
15 **Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algérie;**

16 **<sup>5</sup>Laboratoire de Génie Chimique, LGC, Université de Toulouse, UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS),**  
17 **Toulouse, France.**

18

19 *Correspondance:* atika\_mek@yahoo.fr

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35 **Résumé**

36 Une nouvelle souche, désignée TA4, a été isolée d'un échantillon de l'eau de mer prélevé de  
37 la cote de Tipaza (36°35' Nord, 2°26' Est) par la méthode de suspension dilution, après un  
38 étalement sur le milieu chitine-vitamines agar additionné d'un agent antifongique (actidione à  
39 50 mg/l). L'étude taxonomique basée sur les critères morphologique, physiologique et  
40 moléculaire a rapproché cette souche des espèces de *Streptomyces olivaceus* et *S. pactum*.  
41 L'étude de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide révèle que la souche TA4  
42 possède une forte activité contre deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* 639c  
43 résistante à la méticilline et *Bacillus subtilis* ATCC 6633). La cinétique de la production de  
44 l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par des puits suivie pendant 10 jours sur  
45 le milieu ISP2 liquide a montré que l'incubation pendant 5 jours donne une meilleure activité.  
46 Ce résultat a été confirmé par une deuxième cinétique par la méthode de diffusion de disque  
47 de papiers imbibés par les extraits à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane. La deuxième  
48 cinétique montre aussi que la plus grande activité antibactérienne a été obtenue avec l'extrait  
49 à l'acétate d'éthyle. L'analyse par HPLC de cet extrait montre la présence de deux composés  
50 hydrophobes et le spectre UV-visible montre qu'ils sont de nature aromatique ou  
51 hétérocyclique.

52 **Mot clés:** Biotope marin, *Streptomyces*, taxonomie, activité antibactérienne.

53

54 **Abstract**

55 A new strain, designated TA4, was isolated from a sea water sample collected alongshore of  
56 Tipaza (36°35' North, 2°26'52.8 East) by a serial dilution method, and then spreaded on  
57 chitine-vitamines agar medium supplemented with an antifungal agent (actidione at 50 mg/l).  
58 The taxonomic study based on the morphological, physiological and molecular criteria  
59 showed that this strain is closely related to *Streptomyces olivaceus* and *S. pactum*. The study  
60 of the antimicrobial activity on ISP2 solid medium showed that this strain presents a strong  
61 activity against two Gram positive bacteria (methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 639c  
62 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633). The kinetic of the production of antibacterial activity by  
63 wells diffusion method during 10 days in ISP2 liquid medium showed that incubation for 5  
64 days gives the best activity. This result was confirmed by a second kinetic by diffusion  
65 method using paper discs impregnated with the extracts of ethyl acetate and dichloromethane.  
66 The second kinetic also showed that the highest antimicrobial activity was obtained with the  
67 ethyl acetate extract. The HPLC analysis of this extract showed the presence of two

68 hydrophobic compounds and the the UV spectrum showed that they are aromatic or  
69 heterocyclic in nature.

70 **Keywords:** Marine biotope, *Streptomyces*, taxonomy, antibacterial activity.

71

72

### 73 **1. Introduction**

74 Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif avec un pourcentage de G+C  
75 supérieur à 55 % et qui forment un groupe homogène sur la base des données de la biologie  
76 moléculaire (Manuel de Bergey, 2012). L'actinobactériologie marine est devenu récemment  
77 l'un des principaux domaines de recherche émergents dans le monde entier (Sivakumar et al.,  
78 2007). Les actinobactéries marines se produisent sur les sédiments et dans l'eau et également  
79 sur d'autres biomasses et substrats. Cependant, il n'a pas encore été résolu si ces micro-  
80 organismes font partie de la communauté autochtone microbienne marine, originaire de terre  
81 comme habitat ou ils sont simplement portés à la mer sous forme de spores résistantes  
82 (Larpent et Sanglier, 1989; Goodfellow et Haynes, 1984; Bull et al., 2000).

83 La recherche sur la biodiversité des actinobactéries marine est non seulement  
84 importante pour les études de base (taxonomie et perspectives écologiques), mais également  
85 nécessaire pour leur exploitation (composés bioactif commercialisés, agents anti-tumoraux et  
86 enzymes d'intérêt industriel) (Takizawa et al., 1993; Mincer et al., 2002; Stach et al., 2003).  
87 Ces avantage sont assurés par la diversité de biotope marin qui a exercé une force motrice sur  
88 la sélection des bactéries menant à des nouvelle stratégies d'adaptation et à la synthèse de  
89 nouveaux bio-métabolite actifs (Jensen et Fenical 1996; De Carvalho et Pedro 2010).

90 Depuis la découverte de l'actinomycine, de nombreuses études ont été réalisés,  
91 plusieurs genres ont été découverts mais le genre *Streptomyces* d'origine marine a été plus  
92 fréquemment enregistré, approximativement, plus de deux tiers des milliers d'antibiotiques  
93 naturels ont été isolés principalement à partir de ce genre (Omura, 1992).

94 Plusieurs travaux dans la littérature sur l'isolement des actinobactéries de sédiments et  
95 eaux marins ont suggéré que ces habitats peuvent être utiles pour l'isolement d'un nombre  
96 indéfini d'actinobactéries à potentiel important pour la production de nouveaux produits  
97 utiles. Dans ce contexte, une nouvelle souche de *Streptomyces* a été isolée à partir de l'eau de  
98 mer de la cote de Tipaza qui a été étudiée de point de vue taxonomique et propriété  
99 antagoniste.

100

## 101 2. Matériel et méthodes

102

### 103 2.1. Echantillonnage et isolement de la souche TA4

104 Le prélèvement de l'échantillon d'eau a été réalisé manuellement au niveau de la cote  
105 de Tipaza (36°35' Nord, 2°26' Est). L'échantillon a été prélevé dans un flacon de 1,5 litres, en  
106 verre (préalablement lavé et soigneusement rincé pour éliminer toute trace d'un éventuel  
107 détergeant, séché et stérilisé à l'autoclave 120 °C pendant 20 min) puis remplis, laisser  
108 renouveler plusieurs fois le contenu, en suite fermer hermétiquement sans laisser de bulles  
109 d'air dans le flacon. L'échantillon est transporté au cours de la même journée dans une  
110 glacière (4 °C) et analysé avant 24 h.

111 Une souche désignée TA4 a été isolée par la méthode de suspension dilution et  
112 étalement sur le milieu chitine-vitamines agar (Ch-V) (Hayakawa et Nonomura, 1987)  
113 additionné d'un agent antifongique (actidione à 50 mg/l) afin d'inhiber la croissance des  
114 champignons présents dans l'eau de mer. La conservation a été faite sur le milieu ISP2  
115 (Shirling et Gottlieb, 1966) en tube inclinée à 4 °C.

116

### 117 2.2. Etude morphologique

118 Les caractéristiques morphologiques et culturaux de la souche TA4 ont été étudiées  
119 sur plusieurs milieux: International *Streptomyces* Project ISP1 et ISP2 (Shirling et Gottlieb,  
120 1966), Bennett (Warren et al., 1955) et gélose nutritive (Waksma, 1961). La croissance, la  
121 couleur des mycélium aérien et du substrat et la production des pigments solubles de la souche  
122 TA4 ont été étudié à l'œil nu en utilisant une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated  
123 with Centroid Color: ISCC-NBS) (Kelly et Judd, 1976) après 21 jours d'incubation à 30 °C.  
124 La micromorphologie de la souche a été déterminée par un microscope optique  
125 (grossissements: × 10 et × 40).

126

### 127 2.3. Etude physiologique

128 Les tests utilisés pour la caractérisation de la souche TA4 sont basés sur la méthode de  
129 Locci (1989), elle concerne l'assimilation de vingt glucides et dérivés comme seules sources  
130 de carbone effectués selon la méthode décrite par Gordon et al. (1974) et la dégradation de  
131 onze composés organiques effectués selon les méthodes préconisées par Gordon et al. (1974),  
132 Marchal et al. (1987) et Goodfellow (1971).

133

### 134 2.4. Etude moléculaire et analyse phylogénétique

135 L'isolat TA4 est cultivé sur milieu ISP-2 liquide (Erlenmeyer de 500 mL contenant  
136 100 mL de milieu) en agitation (250 rpm) à 30 °C pendant 5 jours. L'ADN génomique a été  
137 extrait en utilisant le kit d'extraction d'ADN (JetFlex, Allemagne). L'amplification du gène  
138 codant pour l'ARNr 16S est réalisée par Polymerase Chain Reaction (PCR) en utilisant les  
139 amorces 30.10F (5'-GAGTTTGATC-CTGGCTCA-3') et 1500R (5'-  
140 AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), tel que décrit par Rainey et al. (1996). Le mélange  
141 réactionnel contient, pour un volume final de 50 µL: tampon PCR 1× (Tris-HCl 10 mM; KCl  
142 50 mM; pH 9,0 à 25 °C), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de chaque dNTP, 1 mM de chaque  
143 amorce, 1,25 U de *Taq* polymérase et 1 µL (500 ng) d'extrait d'ADN pur. L'amplification du  
144 gène codant pour l'ARN 16S est réalisée dans un thermocycleur "Stratagene RoboCycler  
145 Gradient 96" selon le profil suivant: une étape initiale de dénaturation à 96 °C pendant trois  
146 minutes, suivie de 30 cycles d'amplification à 96 °C pendant une minute, 52 °C pendant une  
147 minute et 72 °C pendant deux minutes. À la fin des cycles, une étape finale consiste à  
148 maintenir le mélange réactionnel à 72 °C pendant dix minutes, lequel est ensuite refroidi à 4  
149 °C. Les amplifiants obtenus sont détectés par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisés  
150 sous ultraviolet (UV) après ajout de bromure d'éthidium. La séquence déterminée du gène  
151 codant pour l'ARN 16S est déposée dans GenBank sous le numéro d'accès KX113521.  
152 Elle a été comparée aux séquences homologues d'espèces microbiennes de référence  
153 répertoriées dans le serveur EzTaxon-e (disponible sur le site Internet: [http://eztaxon-  
e.ezbiocloud.net/](http://eztaxon-<br/>154 e.ezbiocloud.net/)) ( Kim et al., 2012).

155 L'analyse phylogénétique est réalisée en utilisant un logiciel inclus dans MEGA  
156 version 6.0 (Tamura et al., 2013). La séquence du gène codant pour l'ARN 16S de l'isolat  
157 TA4 est alignée grâce au programme CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Le calcul des  
158 matrices des distances d'évolution est réalisé par la méthode de Jukes et Cantor (1969) et la  
159 construction de la topologie de l'arbre phylogénétique est faite par l'algorithme du "neighbor-  
160 joining" (Saitou et Nei, 1987). La validation statistique des liens phylogénétiques établis est  
161 effectuée par le test du Bootstrap dont les valeurs sont basées sur le résultat de 1000 analyses  
162 (Felsenstein, 1985).

163

## 164 **2.5. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche TA4 sur milieu solide** 165 **complexe**

166 L'étude du pouvoir antagoniste de la souche TA4 a été évaluée par la méthode des  
167 cylindres d'agar sur le milieu ISP2 contre deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus*  
168 *aureus* 639c résistante à la méticilline et *Bacillus subtilis* ATCC 6633), deux bactéries à Gram

169 négatif (*Escherichia coli* ATCC 10536 et *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22) trois  
170 champignons filamenteux (*Umbelopsis ramaniana* NRRL 1829, *Aspergillus carbonarius*  
171 M333 et *Fusarium culmorum*) et une levure (*Candida albicans* IPA 200). Toutes ces souches  
172 cibles proviennent de la collection de Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens  
173 (LBSM) de l'Ecole National Supérieure (ENS) de Kouba d'Algérie.

174 Des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre ont été découpés du milieu ISP2 solide  
175 antérieurement ensemencés par l'isolat TA4 en stries très serrées et d'une manière homogène,  
176 après 10 jours d'incubation à 30 °C. Ensuite déposés sur la surface du milieu ISP2 semi solide  
177 préalablement ensemencé par les germes cibles cités auparavant chacun seul, puis incubées à  
178 30 °C pendant 24 à 72 h. La lecture des résultats est réalisée par la mesure des zones  
179 d'inhibition (zone claire) autour des cylindres d'actinobactérie (le diamètre de disque inclus).

180

## 181 **2.6. Cinétique de l'activité antibactérienne, production et extraction de composés actifs** 182 **de la souche TA4**

183 La souche productrice TA4 a été ensemencée dans le milieu ISP2 liquide selon la  
184 méthode décrite par Xinxuan et al. (2010) et incubée dans un shaker à 30 °C et 250 rpm  
185 pendant 48 h, 3 mL de pré-cultures ont été prélevés et transféré vers des erlenmeyers de 500  
186 mL contenant chacun 100 mL de même milieu, les cultures sont incubés pendant 10 jours  
187 dans les mêmes conditions de température et de rotation que les pré-cultures.

188 L'évolution de l'activité antimicrobienne est testée contre *Staphylococcus aureus*  
189 résistante à la méticilline sur le milieu ISP2 semi solide, elle est suivie quotidiennement par la  
190 méthode de diffusion de puits préconisée par Aszalos (1986). L'activité biologique est suivis  
191 également par la méthode de diffusion des disques de papiers imbibés par les extraits  
192 organiques aux dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle ayant un index de polarité  
193 respectivement de 3,1 et 4,4. Les extraits ont été préparés par mélange de 6 mL de filtrat de  
194 culture prélevé chaque 24 h (obtenu par centrifugation) avec le même volume du solvant. Les  
195 extraits organiques sont concentrés à sec puis récupérés respectivement dans 120 µL de  
196 méthanol dont 60 µL ont été utilisés pour imbiber des disques de 6 mm de diamètre.

197

## 198 **2.7. Analyse par HPLC et Spectrophotomètre UV-visible**

199 L'analyse des antibiotiques de l'extrait à l'acétate d'éthyle (60 µL restant de l'extrait  
200 utilisée pour la cinétique) obtenu au jour de la production maximale est réalisée par  
201 chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans un gradient continu et linéaire,  
202 allant de 60 à 100 % de méthanol dans l'eau bidistillée pendant 15 min puis en isocratique

203 dans 100 % de méthanol pendant 30 min. Le débit de l'éluant est de 1,5 mL/min et la  
204 détection se fait à 220 nm.

205 Le spectre UV a été enregistré pour les sommets des pics obtenus dans le profilé  
206 HPLC de cet extrait.

207

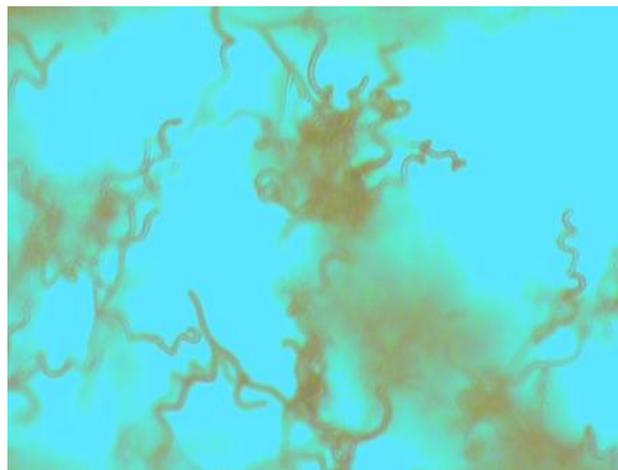
### 208 3. Résultats et discussions

209

#### 210 3.1. Taxonomie et caractéristiques de la souche TA4

211 L'isolat TA4 a une bonne croissance sur tous les milieux de cultures utilisés. Le  
212 mycélium aérien est blanc sur ISP1, brun grisâtre clair sur ISP2, gris clair sur gélose nutritive  
213 et Bennett. Le mycélium de substrat est jaune claire à jaune orangé modérée sur ISP1 et brun  
214 olive modérée sur ISP2, gélose nutritive et Bennett. Aucun pigment diffusible n'est sécrété. Il  
215 possède des chaînes de spores en spirale (Figure 1) typique du genre *Streptomyces* (Bergy's  
216 manuel, 2012).

217



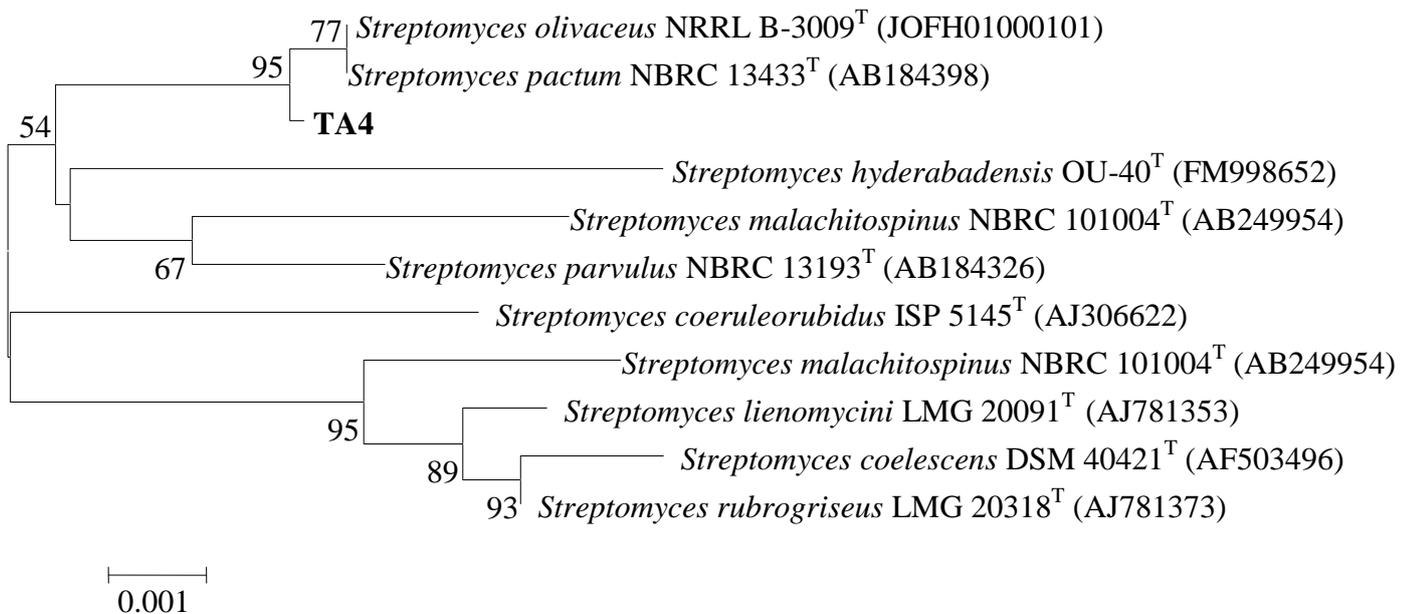
218

219 **Figure 1.** Micromorphologie en microscopie optique de l'isolat TA4 cultivé pendant trois  
220 semaines à 30 °C sur le milieu ISP2 (G × 40 avec effet de zoom).

221

222 L'alignement de la séquence du gène qui code pour l'ARNr 16S de cette souche dans  
223 EzTaxon-e a confirmé son appartenance au genre *Streptomyces*. Elle a montré une similitude  
224 de 99,79 % avec les espèces *Streptomyces olivaceus* et *S. pactum* (Bergy's manuel, 2012)  
225 (Figure 2). Ce Pourcentage est largement supérieur à 98,65 % la limite de séparation entre les  
226 espèces (Kim et al., 2014). Il faut cependant noter qu'un taux d'homologie compris entre  
227 98,65 % et 100 % n'indique pas nécessairement que l'espèce soit identique, surtout si cette  
228 dernière fait partie d'un genre comptant un grand nombre d'espèces comme c'est le cas pour

229 le genre *Streptomyces*. En plus, les deux espèces les plus proches *S. olivaceus* et *S. pactum*  
 230 partagent une similarité de 100 % de leurs ARNr 16S (Bergy's manuel, 2012), ce qui laisse  
 231 suggérer que la souche TA4 pourrait constituer une nouvelle espèce, sous réserve d'une  
 232 hybridation ADN-ADN avec les espèces les plus proches. Ce résultat est soutenu par les  
 233 différences physiologiques de la souche TA4 avec ces deux espèces.  
 234



235  
 236 **Figure 2.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr  
 237 16S, montrant la relation entre l'isolat TA4 et les souches-types des espèces les plus proches  
 238 du genre *Streptomyces*. La barre représente une substitution pour 1000 nucléotides. Les  
 239 valeurs du Bootstrap (supérieures à 50 %) basées sur 1000 analyses sont indiquées au niveau  
 240 des nœuds de l'arbre.

241  
 242 La souche TA4 utilise l'arabinose, le xylose, le mannitol, le rhamnose, le raffinose et  
 243 le *meso*-inositol comme seules source de carbone, par contre l'espèce *S. pactum* n'utilise  
 244 aucun de ces sucre et l'espèce *S. olivaceus* n'utilise pas les deux dernier sucres (nous notons  
 245 que peu de données sont disponibles pour le profil physiologique de *S. olivaceus*) (Bergy's  
 246 manuel, 2012). Le détail de la physiologie de la souche TA4 est donné dans le tableau 1.  
 247  
 248  
 249  
 250

251 **Tableau 1.** Caractéristiques physiologiques de l'isolat TA4.

Tests physiologiques	TA4
<b>Dégradation de:</b>	
Adénine, Amidon, Arbutine, Caséine, Gélatine, Guanine, Hypoxanthine, L-tyrosine, Tween 80 et Xanthine	+
Esculine	-
<b>Utilisation de:</b>	
L-Arabinose, Cellobiose, D-Fructose, D-Galactose, D-Glucose, Inositol, Lactose, D-mannitol, D-Mannose, Maltose, Mélibiose, Mélézitose, Raffinose, Ribose, L-Rhamnose, D-Xylose, Salicine, D-Sorbitol et Tréhalose	+

252

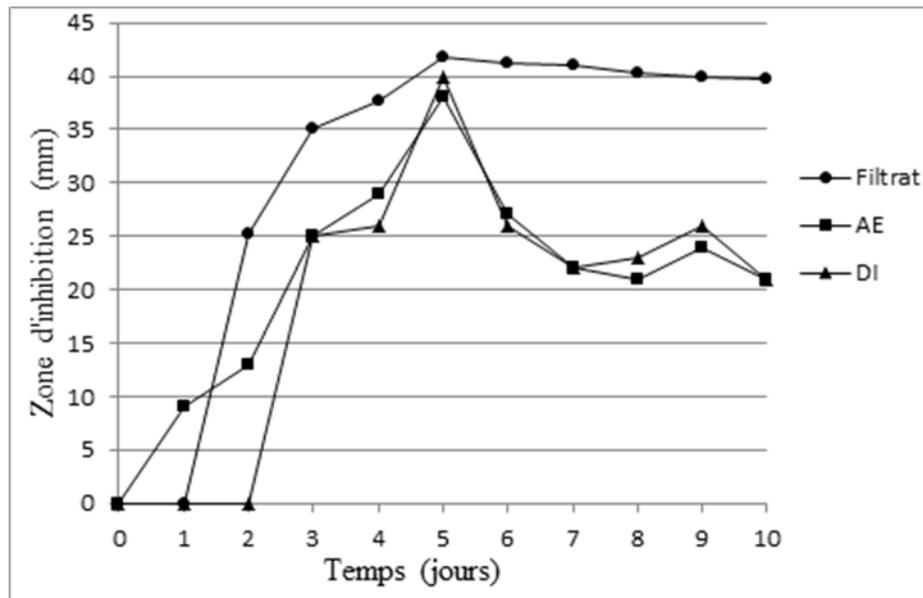
253 **3.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche TA4 sur milieu solide**  
 254 **complexe**

255 La souche TA4 est fortement active contre les bactéries à Gram positif  
 256 (*Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c et *Bacillus subtilis* ATCC 6633) avec  
 257 des diamètres d'inhibition de 40 et 32 mm, respectivement; en revanche, aucune activité n'est  
 258 enregistrée contre les bactéries à Gram négatif ce qui en soi un phénomène connu (Prescott,  
 259 2007). Les champignons mycéliens et la levure testés ne sont pas sensibles aux antibiotiques  
 260 produits par la souche TA4 ce qui ne corrobore pas avec ce qui est cité dans la littérature pour  
 261 les souches de *Streptomyces* connues pour leurs spectre d'action large (Duraipandiyan et al.,  
 262 2010; Thakur et al., 2007; Valanarasu et al., 2008). Le genre *Streptomyces* prédomine le reste  
 263 des genres du phylum d'*Actinobacteria* dans le nombre d'antibiotiques produits (Omura,  
 264 1992).

265

266 **3.3. Cinétique de l'activité antibactérienne**

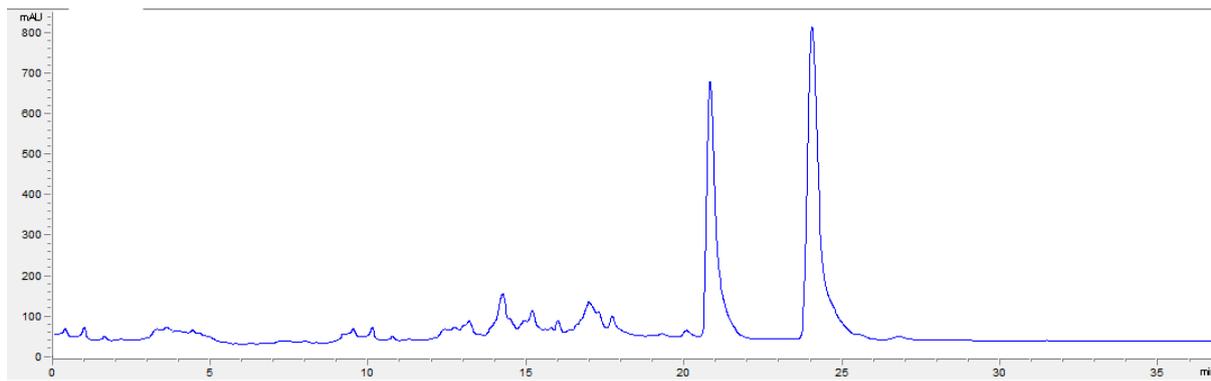
267 Le suivi de l'activité de filtrat de culture de la souche TA4 contre *S. aureus* a montré  
 268 que la production des antibiotiques commence le 2<sup>ème</sup> jour est atteint son maximum (avec un  
 269 diamètre d'inhibition de 32 mm) au 5<sup>ème</sup> jour. L'activité reste stable entre le 5<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup>  
 270 jour (Figure 3).



271  
 272 **Figure 3.** Cinétique de l'évolution des activités antibactérienne dans le milieu ISP2 liquide,  
 273 contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline 639c. L'activité est suivie par la  
 274 méthode de diffusion de puits (Filtrat) et de diffusion des disques de papiers (AE: extrait à  
 275 l'acétate d'éthyle et DI: extrait au dichlorométhane). Les diamètres des puits et des disques ne  
 276 sont pas inclus dans les valeurs des zones d'inhibition.

277  
 278 La cinétique de l'activité antibiotique extraite avec le dichlorométhane et l'acétate  
 279 d'éthyle confirme que le 5<sup>ème</sup> jour est le jour de la production maximale des antibiotiques  
 280 extractibles par ces deux solvants. Cependant, et contrairement à la cinétique de filtrat de  
 281 culture, une diminution de l'activité biologique est enregistrée à partir de 6<sup>ème</sup> jour  
 282 d'incubation (Figure 3). Cela est probablement dû à la nature hydrophile des antibiotiques  
 283 produits par la souche TA4 à partir de 6<sup>ème</sup> jour qui ne sont pas extractible avec les solvants  
 284 utilisés.

285 L'analyse par HPLC de l'extrait à l'acétate d'éthyle au 5<sup>ème</sup> jour d'incubation de la  
 286 culture de la souche TA4 montre la présence de deux composés majoritaires nommés A et B  
 287 élués respectivement après 21 et 24 min à 100 % de méthanol (Figure 4), ce qui confirme la  
 288 nature hydrophobes des antibiotiques extraits.



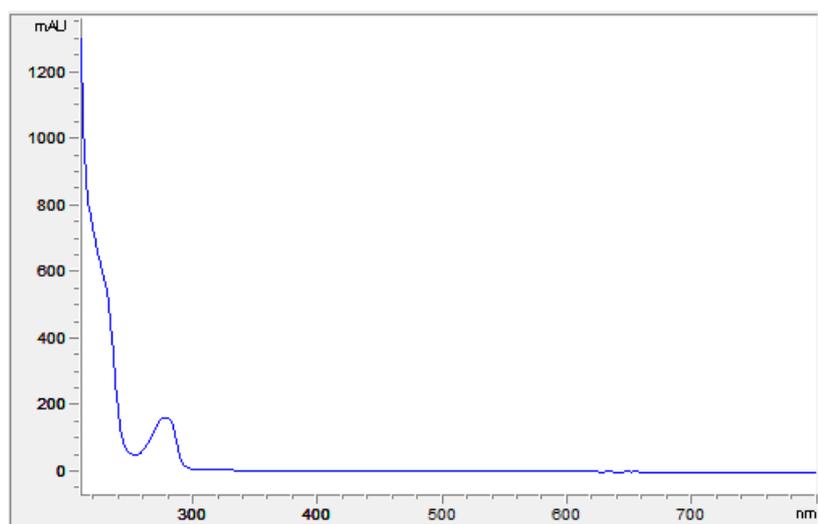
289

290 **Figure 4.** Profile d'éluion en HPLC (obtenue à 220 nm) de l'injection de l'extrait à l'acétate  
 291 d'éthyle.

292

293 Le spectre UV-visible montre des maxima d'absorption entre 270 et 280 nm (Figures  
 294 5 et 6) ce qui suggère la présence de produits aromatiques ou hétérocycliques.

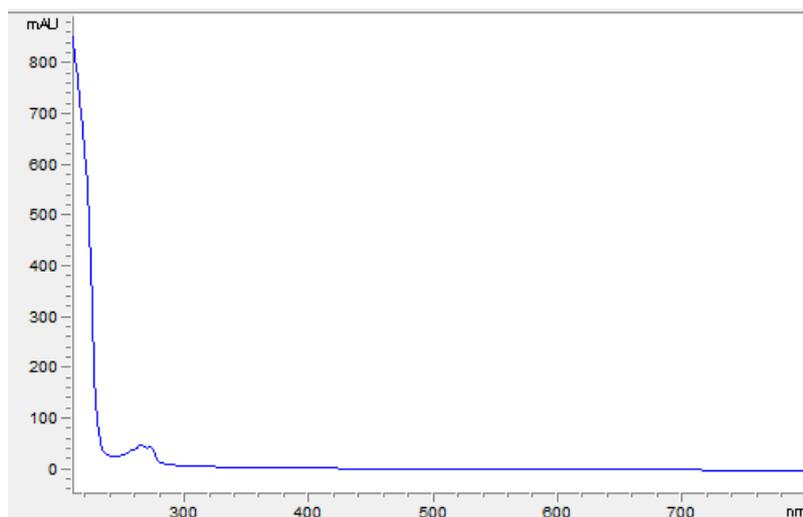
295



296

297 **Figure 5.** Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique A de la souche TA4.

298



299

300 **Figure 6.** Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'antibiotique B de la souche TA4.

301 Les espèces les plus proches de la souche TA4 sont connues pour la production de  
 302 plusieurs antibiotiques comme l'elloramycine produit par *S. olivaceus* (Drautz et al., 1985) et  
 303 la pactamycine produite par *S. pactum* (Bhuyan, 1962).

304

#### 305 4. Références bibliographiques

306

307 Aszalos A., 1986. Modern analysis of antibiotics. Drugs and the Pharmaceutical Sciences.  
 308 Vol. 27. Ed, Marcel Dekker, Inc.

309 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2012. Whitman W.B., Goodfellow M.,  
 310 Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K.I., Parte A. (Eds). vol 5: The  
 311 *Actinobacteria*. 2<sup>ème</sup> édition, Springer, New York. 1750 p.

312 Bull A.T., Ward A.C. and Goodfellow M., 2000. Search and discovery strategies for  
 313 biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:573–606

314 Bhuyan B. K., 1962. Pactamycin Production by *Streptomyces pactum*. *Applied microbiology*.  
 315 10:302–304.

316 De Carvalho C.C.C.R. and Pedro F., 2010. Production of metabolites as bacterial responses to  
 317 the marine environment. *Mar Drugs* 8:705–727.

318 Drautz H., 1985. Metabolic products of microorganisms. *J Antibiot.* 38(10):1291–1301.

319 Duraipandiyar V., Sasi A.H., Islam V.I.H., Valanarasu M. and Ignacimuthu S., 2010.  
 320 Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *J Mycol Med.* 20:15–  
 321 20.

322 Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.  
323 Evolution 39:783–791.

324 Goodfellow M. and Haynes J.A., 1984. Actinomycetes in marine sediments. In Biological,  
325 Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Ortiz-Ortiz L. Bojalil L.F. and  
326 Yakoleff V. (eds). New York, USA: Academic Press, pp. 453–472.

327 Goodfellow M., 1971. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. J. Gen.  
328 Microbiol. 69:33-90.

329 Gordon R. E., Barnett D. A., Handarhan J. E. and Hor-Nay-Pang C., 1974. *Nocardia coeliaca*,  
330 *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 24:54–63.

331 Hayakawa M. and Nonomura H., 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the  
332 selective isolation of soil actinomycetes. J. Ferment. Technol. 65:501–509

333 Jensen P.R. and Fenical W., 1996. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial  
334 products. J Ind Microbiol Biotechnol 17:346–351.

335 Jukes T.H. and Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed)  
336 Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York, pp 21–132

337 Kelly K.L., Judd D.B., 1976. Color. Universal language and dictionary of names (National  
338 Bureau of Standards special publication 440). US Department of Commerce, Washington.

339 Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi  
340 H., Won S. and Chun J., 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene  
341 sequence data- base with phylotypes that represent uncultured species. Int. J. Syst. Evol.  
342 Microbiol. 62:716–721.

343 Kim M., Oh H.S., Park S.C. and Chun J., 2014. Towards a taxonomic coherence between  
344 average nucleotide identity and 16SrRNA gene sequence similarity for species demarcation of  
345 prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:346–351.

346 Larpent J.P. et Sanglier J.J., 1989. Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris. 481 p.

347 Locci R., 1989. Streptomycetes and related genera, p. 2451–2492. In S. T. Williams, M. E.  
348 Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey’s manual of systematic bacteriology, vol. 4. Williams &  
349 Wilkins, Baltimore, MD.

350 Marchal N., Bourdon J.L. et Richard C.L., 1987. Les milieux de culture pour l’isolement et  
351 l’identification biochimique des bactéries. Doin Press, Paris.

352 Mincer T.J. Jensen P.R. Kauffman C.A. and Fenical, W., 2002. Widespread and persistent  
353 populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. Appl. Environ.  
354 Microbiol. 68: 5005–5011.

355 Omura S., 1992. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. ind. Microbiol.*  
356 10:135–156.

357 Prescott LM., Harley JP., Klein DA., 2007. *Microbiologie*. De Boek and Larcier, Bruxelles.  
358 pp. 805–825.

359 Rainey F. A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R. M. and Stackebrandt E., 1996. The genus  
360 *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage  
361 proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:1088–1092.

362 Saitou N. and Nei M., 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing  
363 phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.

364 Shirling E.B., Gottlieb D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J.*  
365 *Syst. Bacteriol.* 16:313–340.

366 Sivakumar K., Kumar Sahu M., Thangaradjou T. and Kannan L., 2007. Research on marine  
367 actinobacteria in India. *Indian J. Microbiol.* 47:186–196.

368 Stach J.E., Maldonado L.A., Masson D.G., Ward A.C., Goodfellow M. and Bull A.T., 2003.  
369 Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl.*  
370 *Environ. Microbiol.* 69: 6189–6200.

371 Takizawa M., Colwell R. and Hill R., 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the  
372 Chesapeake bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 997–1002.

373 Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular  
374 Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725–9.

375 Thakur D., Yadav D., Gogoi B.K. and Bora T.C., 2007. Isolation and screening of  
376 *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for  
377 antimicrobial metabolites. *J. Mycol. Med.* 17:242–249.

378 Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity  
379 of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific  
380 gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.

381 Valanarasu M., Durairandiyan V., Agastian P. and Ignacimuthu S., 2009. *In vitro*  
382 antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil  
383 (India). *J. Mycol. Med.* 19:22–28.

384 Waksman S.A., 1961. Classification, identification, and descriptions of genera and species.  
385 The actinomycetes, vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 331–332.

386 Warren H.B., Prokop J.F., Grundy W.E., 1955. Non-synthetic media for antibiotic producing  
387 actinomycetes. *Antib. Chemother.* 5:6–12.

388 Wang X., Huang L., Kang Z., Buchenauer H, and Gao X., 2010. Optimization of the  
389 Fermentation Process of Actinomycete Strain Hhs.015<sup>T</sup>. Journal of Biomedicine and  
390 Biotechnology. 1-10.