

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 VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'études

PRESENTE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE **MASTER**
EN
SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
OPTION: **MICROBIOLOGIE-BACTERIOLOGIE**

PAR
Nalubega FATUMA

Thème

CARACTÉRISATION POLYPHASIQUE ET POTENTIEL ANTAGONISTE DE QUELQUES SOUCHES D'ACTINOBACTÉRIES

3/26/2016

Devant le jury compose de:

M^{me} HAMAIDI F.M.C.A Université de Blida 1 Présidente

M^{me} AIT SAADI N.M.C.A Université de Blida 1 Examinatrice

M^{me} MEKLAT A.

M.C.A Université de Blida 1

Promotrice

M^{me} CHAABANE CHAOUCHE 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 abouti.

À **Mr Sabaou Nasserline**, directeur de laboratoire LBSM de Kouba, nous le remercions pour la confiance qu'il nous a accordé en nous accueillant et pur 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.

À notre perle rare, notre promotrice **Mme Meklat**, maitre de conférences 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 de 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 et pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

À **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 **Mme Verheecke Carol**, chercheur à l'ENSAT de Toulouse pour la réalisation de la microscopie électronique et la PCR.

À **Mme Hamaidi F.**, MCA à l'université Saad Dahleb de Blida 1, 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 Saad Dahleb de Blida 1, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

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

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

Dedications

All praises and thanks are to Allah, the Almighty who has enabled me to come to this accomplishment. Without His permission, nothing can ever be attained. Verily, He is the most gracious, the most merciful.

I would like to take this opportunity to pray for my late father who never lived to experience this moment. May Allah forgive him for where he went wrong and grant him paradise.

I dedicate my work to my dear mother who has always given in all that she could in order to see me complete my studies and to make me, by Allah, into the person that I am today. Indeed, there is no way that I can ever repay her. May Allah grant her good health and always guide and protect her.

To the rest of the people who have endorsed my studies in one way or another; my promoter, my grandmother, siblings, friends, relatives, guardians...not to mention but a few. May Allah reward them all abundantly!

I love you all for the cause of Allah, may He increase us in knowledge and guidance for both this world and the hereafter.

In honour of my promoter, madame Atika Meklat, my co-promoter madame Chaouche Chaabane Fawzia and my co-worker, Mellouk Imène.

Résumé

Un total de 16 isolats provenant d'une collection d'actinobactéries isolées du sol par Meklat a été étudié de point de vue taxinomique et potentiel antagoniste.

La taxinomie des 16 actinobactéries a été étudiée en utilisant une approche polyphasique basée sur les caractérisations morphologique, physiologique et moléculaire (séquençage et analyse phylogénétique de l'ADN ribosomique 16S). Les résultats obtenus nous ont permis de classer nos isolats dans six genres fréquents à rares; *Streptomyces* (9 souches), *Streptosporangium* (3 souches), *Microbispora* (1 souche), *Nocardia* (1 souche), *Nocardiopsis/ Saccharothrix* (1 souche) et un genre non identifié (1 souche). Une des souches de *Streptomyces* et les trois souches de *Streptosporangium* partagent de faibles similarités d'ADNr 16S (inférieure à 98,65 %) avec les espèces les plus proches de chaque genre, ce qui confirme la présence d'au moins 4 nouvelles espèces.

Le potentiel antagoniste des 16 souches d'actinobactéries a été évalué contre huit germes-cibles sur le milieu ISP2 par la technique des cylindres d'agar. 12 souches (75 %) se sont montrées actives contre au moins un germe-cible. L'activité antimicrobienne est estimée à 100 % des *Streptomyces* et *Nocardiopsis/ Saccharothrix* et 33,3% des *Streptosporangium*. L'activité antibactérienne est obtenue uniquement contre les bactéries à Gram positif et elle est relativement plus intéressante que l'activité antifongique.

L'évaluation du potentiel antagoniste des 16 souches d'actinobactéries en utilisant des cylindres d'agar provenant des milieux synthétiques constitués de quelques sucres qui favorisent leur croissance contre trois germes-cibles a montré que 62,5 % des souches sont actives, ce qui est inférieur par rapport à l'activité obtenue sur le milieu ISP2. Cependant, certaines souches inactives sur ISP2 ont montré une activité sur le milieu synthétique additionné des sucres comme est le cas de la souche D8.

Mots clés: Actinobactéries, taxinomie polyphasique, antagonisme, milieu synthétique, milieu complexe.

ملخص

درست 16 سلالة من مجمع للأكتينوبكتيريا المعزولة من التربة من طرف ميكلات من الناحية التصنيفية والقدرة التضادية.

تمت الدراسة التصنيفية باستعمال مقارنة متعددة المراحل: مورفولوجية وفيزيولوجية وجزئية (تحديد تسلسل النكليوتيدات للمورثة المشفرة لـ ARN الريبوزومي 16S ودراسة الانتساب الوراثي). تمكنا من خلال النتائج من تصنيف عزلاتنا في ست أجناس شائعة إل نادرة: *Streptomyces* (9 سلالات) و *Streptosporangium* (3 سلالات) و *Microbispora* (سلالة واحدة) و *Nocardia* (سلالة واحدة) و *Nocardiopsis/Saccharothrix* (سلالة واحدة) و جنس غير محدد (سلالة واحدة).

سلالة واحدة من الجنس *Streptomyces* و ثلاث سلالات من *Streptosporangium* أظهرت نسب ضئيلة من التشابه المعتمدة على الجين المشفر لـ ARNr16S (أقل من 98,65%) مع الأنواع الأكثر قرابة لكل جنس، مما يؤكد وجود أربعة أنواع أصيلة على الأقل.

قدر الكمون التضادي لسلالات الأكتينوبكتيريا 16 بواسطة تقنية أسطوانات الأغار. أثبتت 12 سلالة (75%) فعاليتها ضد جرثوم مستهدف واحد على الأقل. قدر النشاط المضاد للميكروبات بـ 100% عند *Streptomyces* و *Nocardiopsis/Saccharothrix* و 33,3% عند *Streptosporangium*. كان النشاط المضاد للبكتيريا ضد البكتيريا ذات غرام موجب فقط وهو نسبيا أكثر أهمية من النشاط المضاد للفطريات.

أثبت تقدير الكمون التضادي لسلالات الأكتينوبكتيريا 16 ضد ثلاثة جراثيم مستهدفة بواسطة تقنية أسطوانات آغار مأخوذة من أوساط اصطناعية مشكلة من بعض السكريات المحفزة لنموها أن 62,5% من السلالات لها نشاط ميكروبي. تعتبر نسبة النشاط هذه أقل من نسبة النشاط المتحصل عليها باستعمال الوسط ISP2، إلا أن بعض السلالات غير فعالة على ISP2 أظهرت فعاليتها على الوسط الإصطناعي المضاف إليها سكر كما هو الحال بالنسبة للسلالة D8. تجدر بنا الإشارة أيضا إلى تحسن الفعالية ضد ميكروبية على الوسط الإصطناعي بالنسبة لبعض السلالات الأخرى.

الكلمات المفتاحية: أكتينوبكتيريا، التصنيف متعدد المراحل، التضاد، وسط اصطناعي، وسط معقد

Abstract

A total of 16 isolates coming from a collection of actinobacteria isolated by Meklat was studied from a taxonomic and an antagonistic potential point of view.

The taxonomy of the 16 actinobacteria was studied using a polyphasic approach based on the morphological, physiological and molecular (sequencing and phylogenetic analysis of the 16S ribosomic DNA) characterisations. The obtained results enabled us to class our isolates under 6 frequent to rare genera; *Streptomyces* (9 strains), *Streptosporangium* (3 strains), *Microbispora* (1 strain), *Nocardia* (1 strain), *Nocardiopsis*/*Saccharothrix* (1 strain) and a non-identified genus (1 strain). One of the *Streptomyces* strains and the three *Streptosporangium* strains had low 16S rDNA similarities (inferior to 98.65 %) to the closest species of each genus, this which confirms the presence of at least four (4) new species.

The antagonistic potential of the 16 actinobacterial strains was evaluated against eight target-germs on ISP2 medium by the agar cylinder method. 12 strains (75 %) were active against at least one target germ. The antimicrobial activity is estimated at 100 % for *Streptomyces* and *Nocardiopsis*/*Saccharothrix* and at 33.3% for *Streptosporangium*. Antibacterial activity was obtained only against the Gram positive bacteria and it is relatively more interesting than the antifungal activity.

Evaluation of the antagonistic potential of the 16 actinobacterial strains against three target germs while using agar cylinders coming from synthetic media supplemented with some sugars which favour their growth showed that 62.5 % of the strains are active, this which is inferior compared to the activity obtained on the ISP2 medium. However, some inactive strains on ISP2 medium showed activity on the synthetic medium added with sugars as it is the case for strain D8.

Keywords: Actinobacteria, polyphasic taxonomy, antagonism, synthetic medium, complex medium.

List des figures

	Page
Figure 1. Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de <i>Streptomyces</i> (Bergey, 2012).	14
Figure 2. Micrographie de <i>Streptosporangium saharensense</i> SG20 ^T (Chaabane Chaouch <i>et al.</i> , 2016).	15
Figure 3. Micrographie de <i>Nocardia farcinica</i> IPV2110 (Locci, 1976).	16
Figure 4. Micrographie de <i>Microbispora rosea</i> ATCC 12950 ^T (Nonomura et Ohara 1957).	17
Figure 5. Micrographie de l'isolat H18 de <i>Nocardiostrictis</i> sp. (Meklat, 2012).	18
Figure 6. Micrographie de <i>Saccharothrix saharensis</i> (Boubetra, 2013).	19
Figure 7. Séquençage et phylogénie du gène de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S).	29
Figure 8. Illustration de l'obtention de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S à partir des deux séquences obtenues par le séquençage.	29
Figure 9. Illustration des étapes de la méthode des cylindres d'agar.	31
Figure 10. Micrographie la souche A12 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).	33
Figure 11. Micrographie de la souche A3' observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).	33
Figure 12. Micrographie de la souche H3 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (A) et au microscope électronique (B)(x 400 plus effet de zoom).	34
Figure 13. Micrographie de la souche B4 observée au microscope électronique.	34
Figure 14. Micrographie de la souche E2 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).	35
Figure 15. Micrographie de la souche D8 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).	35
Figure 16. Micrographie de la souche F3 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).	36
Figure 17. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les isolats de <i>Streptomyces</i> et les souches-types de quelques espèces de ce genre.	45
Figure 18. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les souches de <i>Streptosporangium</i> et les souches-types de toutes les espèces de ce genre.	47
Figure 19. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre la souche de <i>Microbispora</i> et les souches-types de toutes les espèces de ce genre.	48
Figure 20. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre la souche de <i>Nocardia</i> et les souches-types de quelques espèces de ce genre.	49
Figure 21. Activité antifongique des souches d'actinobactéries contre quelques champignons. (Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus)	58

Figure 22. Activité antibactérienne des souches d'actinobactéries contre quelques bactéries à Gram positives. (Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus)	59
Figure 23. Activité antagoniste de la souche A8 contre MRSA et <i>Fusariumculmorum</i> .	60
Figure 24. Activité antagoniste de la souche A12 contre MRSA, <i>F. culmorum</i> et <i>C. albicans</i> .	61
Figure25. Activité antagoniste de la souche C8 contre MRSA.	61
Figure 26. Activité antagoniste de la souche G3 contre MRSA et <i>Fusariumculmorum</i> .	62
Figure 27. Activité antagoniste de la souche A3' contre MRSA.	62
Figure 28. Activité antagoniste de la souche A4 contre MRSA.	63
Figure 29. Activité antagoniste de la souche F3 contre MRSA.	63
Figure 30. Activité antagoniste de la souche H4 contre MRSA.	64

List des abbreviations

ADN	Acidedeoxyribonucléique
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
ARNr	Acideribonucléique
DAB	Acidediaminobutyrique
DAP	Acidediaminopimélique
EDTA	Ethylene diamine tetracyclic acid
ISP	International <i>Streptomyces</i> project
GN	Gélose nutritive
MA	Mycéliumaérien
MLSA	Multilocus sequence analysis
MRSA	Staphylococcus aureus résistante à la méthicilline
MS	Mycélium du substrat
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SM	Coéfficient de Sokal et Michener

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1. Les chimiotypes chez les actinobactéries (Becker <i>et al.</i> ,1965; Yamaguchi, 1965; Lechevalier et Lechevalier, 1970b).	7
Tableau 2. Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les actinobactéries (Lechevalier <i>et al.</i> , 1977).	8
Tableau 3. Profils des acides gras chez les actinobactéries (Kroppenstedt, 1985).	9
Tableau 4. Types des ménaquinones chez les Actinobactéries (Kroppenstedt, 1985).	10
Tableau 5. Provenance des isolats d'actinobactéries et les milieux d'isolement.	23
Tableau 6. Germes cibles utilisés.	23
Tableau 7. Constituants des milieux de culture; Bennett, GN, ISP1 et ISP2, préparés pour l'étude morphologique.	24
Tableau 8. Composition et préparation du milieu de culture pour chaque test et la mise en évidence de la dégradation.	26
Tableau 9. Suivi de la croissance des isolats d'actinobactéries.	32
Tableau 10. Caractéristique et croissance des 16 isolats sur différents milieux.	37
Tableau 11. Caractéristiques physiologiques des isolats de <i>Streptomyces</i> .	40
Tableau 12. Caractéristiques physiologiques des isolats non <i>Streptomyces</i> .	41
Tableau 13. Valeurs de l'indice de Sokal et Michener pour les souches de <i>Streptomyces</i> .	42
Tableau 14. Valeurs de l'indice de Sokal et Michener pour les souches de <i>Streptosporangium</i> .	42
Tableau 15. Résultats du blast des séquences des souches du genre <i>Streptomyces</i> avec les espèces les plus de ce genre.	44
Tableau 16. Résultats du blast des séquences des souches du genre <i>Streptosporangium</i> avec les espèces les plus de ce genre.	46
Tableau 17. Résultats du blast de la séquence de la souche B4 avec les espèces les plus du genre <i>Microbispora</i> .	48
Tableau 18. Résultats du blast de la séquence de la souche E2 avec les espèces les plus du genre <i>Nocardia</i> .	49
Tableau 19. Comparaison des caractères physiologiques l'isolat A4' avec <i>S. psammoticus</i> , l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Virgilio et Hengeller, 1960).	51
Tableau 20. Comparaison des caractères physiologiques la souche A12 avec <i>S. samsunensis</i> , l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Sazaket <i>et al.</i> , 2011).	52
Tableau 21. Comparaison des caractères morphologiques et physiologiques la souche D1 avec <i>S. glebosus</i> , l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Rong et Huang, 2012).	53
Tableau 22. Comparaison des caractères physiologiques la souche H4 avec <i>S. avellaneus</i> (Baldacci et Grein, 1966) et <i>S. aureofaciens</i> (Duggar, 1948), les espèces les plus proches phylogénétiquement.	53
Tableau 23. Comparaison des caractères physiologiques des souches A1 et H3 avec <i>Sg. album</i> et A9 avec avec <i>Sg. Carneum</i> , les espèces les plus proche phylogénétiquement (Nonomura H et Ohara Y, 1960; Mertz et Yao, 1990).	55
Tableau 24. Comparaison des caractères physiologiques l'isolat B4 avec <i>M. bryophytorum</i> , l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Chuanget <i>et al.</i> , 2015).	56
Tableau 25. Comparaison des caractères physiologiques la souche E2 avec <i>N. nova</i> l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Tsukamura, 1983).	56

TABLE DES MATIERES

Dédicaces

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

INTRODUCTION

1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. DEFINITION ET DISTRIBUTION DES ACTINOBACTERIES

3

1. Définition des Actinobactéries

3

2. Distribution des actinobactéries

3

II. TAXINOMIE DES ACTINOBACTERIES

4

1. Critères d'identification des genres

4

1.1. Critères morphologiques

5

1.1.1. Critères macromorphologiques

5

1.1.2. Critères micromorphologiques

5

1.2. Critères chimiques

6

1.2.1. Acides aminés pariétaux

6

1.2.2. Sucres cellulaires

6

1.2.3. Lipides membranaires et pariétaux

7

1.2.3.1. Phospholipides membranaires

7

1.2.3.2. Acides gras

8

1.2.3.3. Ménaquinones

9

1.2.3.4. Acides mycoliques

10

2. Critères d'identification des espèces

10

2.1. Critères physiologiques

10

2.2. Critères moléculaires

11

2.2.1. Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S

11

2.2.2. Hybridation ADN-ADN

12

2.2.3. Détermination du pourcentage de guanine + cytosine

12

2.2.4. Autres techniques moléculaires	13
3. Description de quelques genres d'Actinobactéries	13
3.1. Genre <i>Streptomyces</i>	13
3.2. Genre <i>Streptosporangium</i>	15
3.3. Genre <i>Nocardia</i>	15
3.4. Genre <i>Microbispora</i>	16
3.5. Genre <i>Nocardiopsis</i>	17
3.6. Genre <i>Saccharothrix</i>	18
III. IMPORTANCE DES ACTINOBACTERIES	19
1. Dans le domaine agronomique	19
2. Dans les domaines médico-vétérinaire et industriel	21
MATERIEL ET METHODES	23
I. MATERIEL	23
II. METHODES	24
1. Repiquage et suivi de la croissance des isolats	24
2. Étude taxonomique	24
2.1. Préparation des cultures	24
2.2. Caractérisation micromorphologique	25
2.2.1. Observations au microscope photonique	25
2.2.2. Observations au microscope électronique	25
2.3. Caractérisation macromorphologique des isolats	25
2.4. Caractérisation physiologique des isolats	25
2.4.1. Tests de dégradation effectués par la technique d'ensemencement par point	25
2.4.2. Tests effectués par la technique d'ensemencement par stries	27
2.4.3. Calcul de coefficient de Sokal et Michener	27
2.5. Caractérisation moléculaire des isolats	28
2.5.1. Extraction de l'ADN génomique	28
2.5.2. Amplification et séquençage	28
2.5.3. Étude phylogénétique des souches	29
3. Étude de l'activité antagoniste des souches d'actinobactéries	30
3.1. Évaluation du potentiel antagoniste des isolats sur un milieu complexe	31
3.2. Étude du potentiel antagoniste des souches dans un milieu synthétique en variant les sources de carbone	31

RESULTATS ET DISCUSSION

I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOBACTERIES	32
1. Évaluation de la croissance des actinobactéries sur le milieu ISP2 solide	32
2. Caractérisation des isolats d'actinobactéries	32
2.1. Étude morphologique	32
2.1.1. Caractérisation micromorphologie	32
2.1.2. Caractérisation macromorphologie	36
3. Caractères physiologiques	39
4. Étude moléculaire	43
5. Discussion	50
II. ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTE	57
1. Évaluation du potentiel antagoniste des 16 souches d'actinobactéries sur le milieu ISP2	57
2. Évaluation du potentiel antagoniste des souches d'actinobactéries sur des milieux synthétiques contenant une seule source de carbone	59
3. Discussion	64
Conclusion et perspectives	67
Références bibliographiques	69
Annexes	81

INTRODUCTION

Actinobacteria est l'un des phylas majeurs du domaine *Bacteria* d'après l'analyse basée sur le gène codant pour l'ARNr 16S (Garrity et Holt, 2001; Ludwig et Klenk, 2005; Zhi et al., 2009). Ce taxon regroupe des organismes qui sont phénotypiquement divers avec des propriétés morphologiques variées s'étendant des cocci aux mycéliums hautement différenciés. La composition en G + C de l'ADN des membres de ce phylum est élevée (elle varie d'environ 50% jusqu'à plus de 70%) (Bergey's Manual, 2012).

Les actinobactéries sont énormément distribuées dans les habitats aquatique et terrestre (Goodfellow et Williams, 1983; Williams et al., 1984; Stachet Bull, 2005), y compris les habitats extrêmes tels que les sédiments marins profonds (Pathom-aree et al., 2006), les sols des déserts hyper-arides comme le désert d'Atacama et le désert de Sahara (Okoro et al., 2009; Meklat et al., 2011). Ils sont en particulier fréquents dans le sol, jouant des rôles dans la dégradation de la matière organique et des molécules récalcitrantes (Goodfellow et Simpson, 1983; Goodfellow et Williams, 1983). D'autres actinobactéries sont des pathogènes pour l'Homme et les animaux (*Dermatophilus*) (Garcia et Isenberg, 2007) et pour les plantes (ex: *Rhizoctonia*), des commensaux des plantes (ex: *Leifsonia*), des symbiotes (ex: *Frankia*) et des commensaux du tractus gastro-intestinal (ex: *Bifidobacterium*) (Bergey's Manual, 2012).

Ces microorganismes ont une capacité considérable de produire une variété des métabolites secondaires (Solanki et al., 2008) à activité biologique comme les antitumoraux (Chang et al., 2011), les antioxydants (Karthik et al., 2013), les immunosuppresseurs (Berdy, 2005) et surtout les antibiotiques (Solanki et al., 2008). En fait, depuis la découverte des antibiotiques à partir des actinobactéries telluriques par Waksman et Woodruff (1940), 70% des métabolites secondaires a été obtenus par ce groupe (Subramani et Aalbersberg, 2012) et ils sont vraisemblablement le groupe le plus important parmi les microorganismes qui produisent les antibiotiques (Suzuki et al., 1994; Takahashi et Omura, 2003; Demain 2006). Parmi les actinobactéries, le genre *Streptomyces* est le plus grand producteur d'antibiotiques (Okami and Hotta 1988; Solecka et al., 2012). Cependant, d'autres genres rares comme *Nocardia*, *Nocardioopsis* et *Streptosporangium* produisent un nombre élevé d'antibiotiques intéressants (Genilloud et al., 2010).

L'apparition de nouvelles souches bactériennes résistantes ou multirésistantes aux antibiotiques cliniquement utilisés comme la souche K44 de *Klebsiella pneumoniae* (Touati, 2006); l'incidence accrue des infections fongiques en particulier chez les patients immunodéprimés comme des souches non-albicans de *Candida* spp. causant la candidose invasive (Lowet Rotstein, 2011); la pathogénicité de quelques champignons qui ont été originellement non pathogènes pour l'homme (Bauda et Monfort, 2004) et le développement de la résistance aux antifongiques comme le cas de *Candida glabrata* (Vandputte, 2008) malgré le nombre réduit d'antifongiques utilisables en thérapeutique; et la toxicité de certains antibiotiques d'entre eux (Berdy, 1989; Accoceberry et Noël, 2007) ont incité l'industrie pharmaceutique et les laboratoires de recherche à trouver de nouvelles molécules plus efficaces et moins toxiques (Caboche et al., 2008).

Cette thématique et l'un des axes de recherche du laboratoire de biologie des systèmes microbiens qui nous a fourni une collection d'actinobactéries isolées par Meklat (travaux en cours) pour les étudier de point de vue taxonomique (identification polyphasique) et évaluation de leur potentiel antagoniste.

Ce travail est présenté en trois parties:

La première partie est réservée à une synthèse bibliographique portant sur les actinobactéries. Nous avons présenté leur distribution, leur taxonomie avec la description de quelques genres et leur importance.

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

Dans la troisième partie, il y a les résultats et les discussions. Ils concernent l'étude taxonomique polyphasique des souches d'actinobactéries. 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 et par la recherche de l'influence de nombreux sucres sur la production d'antibiotiques par ces souches.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. DEFINITION ET DISTRIBUTION DES ACTINOBACTERIES

1. Définition des Actinobactéries

Les actinobactéries (anciennement appelées actinomycètes) ont été souvent considérées comme un groupe de microorganismes intermédiaires entre les vrais champignons et les bactéries (Waksman, 1950). Cependant, la découverte de leur structure cellulaire fine (procaryote) et de la composition chimique de leur paroi, à partir de 1950, a permis par la suite de les classer définitivement parmi les bactéries (Wellington et Ul-Hassan, 2009).

Des définitions actualisées ont été rapportées par les différentes éditions du manuel de Bergey. Dans l'édition de 2012 de ce manuel, les actinobactéries sont définies comme étant des bactéries à Gram positif ayant un taux élevé en guanine + cytosine (supérieur à 55%) et qui forment un groupe homogène sur la base des données de la biologie moléculaire (séquençage de l'ADN ribosomique 16S).

Le taxon *Actinobacteria* est l'un des embranchements majeurs dans le domaine des *Bacteria* comme inféré d'après son motif de ramification dans l'arbre phylogénétique des gènes ARNr 16S (Garrity et Holt, 2001; Ludwig et Klenk, 2005) et les signatures d'ARNr 16S spécifiques au taxon (Zhiet *al.*, 2009). Le phylum des *Actinobacteria* contient 6 classes, 21 ordres, 53 familles et 221 genres (Bergey, 2012) alors qu'il contenait un seul ordre, une seule famille et 7 genres en 1916 (Buchanan, 1916).

La classe *Actinobacteria* et ses taxons constitutifs supérieurs au genre ont été proposés par Stackebrandt *et al.* (1997), uniquement sur la base des séquences du gène de l'ARNr 16S. Elle a été actualisée par Zhiet *al.* (2009). Cette classification a montré un changement dans la classification à ces niveaux et elle a montré que les classifications préalables ont été manquantes parce qu'elles n'ont pas reflété des relations naturelles (Bergey's Manual, 2012). L'histoire évolutionnaire du phylum *Actinobacteria* a été tracée par Ventura *et al.* (2007).

Physiologiquement, les actinobactéries sont aérobies strictes, mais certaines sont aérobies facultatives. La grande majorité est chimio-hétérotrophe capable d'utiliser une grande variété de sources d'énergie, y compris les polymères complexes (Lechevalier, 1988; Zimmerman, 1990).

2. Distribution des actinobactéries

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires qui proviennent de différents substrats, en particulier du sol, qui représente le réservoir le plus riche en ces bactéries (10 à 20%

de la microflore tellurique) (Ishizawa et Araragi, 1976) et ils sont la source de colonisation de nombreux biotopes (Dommergues et Mangenot, 1970).

Généralement, parmi les genres les plus fréquemment rencontrés dans les sols, *Streptomyces* prédomine avec un pourcentage de 80 à 95% du total des actinobactéries (Elwanet *al.*, 1985; Williams, 1978), suivi par *Nocardia* et *Micromonospora* (Ishizawa et Araragi, 1976).

Leur grande capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales et leur grande variabilité métabolique leur ont permis d'être répartis à l'échelle universelle dans presque tous les écosystèmes (Goodfellow et Williams, 1983) tels que l'air, les eaux douces et les eaux de mer, le fumier, les composts, le foin, les débris végétaux, les litières, le pollen des plantes, les abeilles, les ruches des abeilles, les plantes en culture, les lichens et plusieurs autres substrats (Lacey, 1973; Weyland, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Goodfellow *et al.*, 1990; Lacey, 1997; Kim *et al.*, 1998; Taechowisanet *al.*, 2003; González *et al.*, 2005; Promnuanet *al.*, 2009; 2011). Elles sont aussi retrouvées dans des écosystèmes particuliers tels que les déserts chauds, les glaciers, les sites pollués par des hydrocarbures ou par des métaux lourds, les grottes naturelles, les sédiments marins profonds et les lacs alcalins ou salés (Lechevalier, 1981; Grothet *al.*, 1997; Sabaouet *al.*, 1998; Monchevaet *al.*, 2002; Pathom-areeet *al.*, 2006; Okoroet *al.*, 2009), le pétrole brut et des sédiments océaniques situés à plus de 4000 m de profondeur (Cross, 1981; Goodfellow et Williams, 1983).

La majorité des actinobactéries est saprophyte mais il existe certaines formes symbiotiques, ou pathogènes pour les plantes (*Streptomyces scabies*), les animaux (*Actinomyces bovis*) ou l'Homme (*Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides*) (Becking, 1974; Locci, 1994; Lacey, 1997; Peltolaet *al.*, 2001; Goodfellow et Williams, 1983).

II. TAXINOMIE DES ACTINOBACTERIES

La taxinomie des actinobactéries se base sur une approche polyphasique, qui tient en compte les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et génétiques.

1. Critères d'identification des genres

Les actinobactéries comprennent des genres d'une grande variabilité morphologique, allant du cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharothrix*) et ceux qui possèdent un mycélium bien différencié et persistant (*Streptomyces*, *Actinomadura*,

Streptosporangium). (Bergey's Manual, 2012). L'identification de la plupart de ces genres est basée sur leurs critères morphologiques et chimiques.

1.1. Critères morphologiques

Ces critères peuvent être macromorphologiques et/ou micromorphologiques. Pour certains genres comme *Streptomyces*, *Saccharomonospora*, *Micromonospora*, etc., leurs caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance.

1.1.1. Critères macromorphologiques

Ils comprennent les caractéristiques culturelles des actinobactéries sur des milieux de culture solides différents qui sont déterminés par observation de la présence ou l'absence et la couleur :

- du mycélium aérien (MA); il est présent dans la plupart des cas et absent dans quelques cas par exemple chez les genres *Rhodococcus* et *Actinoplanes*.
- du mycélium du substrat (MS); Tous les genres d'actinobactéries possèdent un MS sauf *Sporichthyadont* le MA est rattaché au substrat solide par des cellules "crampons" (Lechevalier *et al.*, 1986).
- des pigments solubles dans le milieu de culture.

1.1.2. Critères micromorphologiques

Les critères micromorphologiques sont:

- La fragmentation ou non du MS (Shirling et Gottlieb, 1966).
- La présence ou non de spores mobiles (ex: *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex: *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, nombreux autres genres), leur agencement (isolées, par deux, en chaînes), leur taille, la forme des chaînes de spores sur le MA et /ou le MS, la présence ou non de sporophores et l'ornementation de la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue)(Shirling et Gottlieb, 1966).
- La présence de structures particulières comme les sporanges (la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores), les synnemata (comme *Actinosynnema*), les sclérotés, les faux sporanges (comme *Kibdelosporangium*), etc. sur le MA (Shirling et Gottlieb, 1966).

1.2. Critères chimiques

La chimiotaxonomie est basée sur l'analyse des acides aminés pariétaux, des glucides des cellules entières et des lipides membranaires. Les actinobactéries ont été classées dans dix chimiotypes selon leur composition cellulaire en acides aminés pariétaux (Becker *et al.*, 1965; Yamaguchi, 1965) et en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970_b) (Tableau 1).

1.2.1. Acides aminés pariétaux

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 (méso) et la glycine qui est variablement présente (Lechevalier et Lechevalier, 1970_b).

Selon la composition en acides aminés, les actinobactéries sont classées dans les chimiotypes I à VIII. Les chimiotypes pariétaux ont permis de distinguer, par exemple, entre les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix*, ces genres présentant des caractères morphologiques assez proches (Williams et Wellington, 1981) (Tableau 1).

1.2.2. Sucres cellulaires

Ils sont présents dans les cellules entières. Les sucres taxonomiquement importants pour les actinobactéries sont les couples arabinose-galactose, arabinose-xylose, rhamnose-galactose ainsi que le madurose ou 3-O-méthyl-galactose (Lechevalier et Lechevalier, 1970_a; Labeda et Lechevalier, 1989; Stackebrandt *et al.*, 1994). Sur cette base, il existe ainsi les chimiotypes A, B, C, D et E, définis par Lechevalier et Lechevalier (1970_{a,b}). Les actinobactéries ne possédant pas ces sucres sont classées dans le chimiotype C (Tableau 1).

Tableau 1. Les chimiotypes chez les actinobactéries (Becker *et al.*, 1965; Yamaguchi, 1965; Lechevalier et Lechevalier, 1970_b)

Chimiotype	DAP		Gly	Lys	Orn	DAB	Asp	Sucres				Genres représentatifs
	LL	DL						Ara+Gal	Xyl+Ara	Rha+Gal	Mad	
I C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Sporichthya</i> , etc.
II D	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>Actinoplanes</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Glycomyces</i> , etc.
III B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Streptosporangium</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Actinomadura</i> , etc.
III C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Nocardiosis</i> , <i>Thermomonospora</i> , etc.
III E	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Saccharothrix</i> , <i>Kutzneria</i> , <i>Actinosynema</i>
IV A	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Pseudonocardia</i> .
V	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Actinomyces</i> .
VI	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i> .
VII	-	-	+	V	-	+	-	-	-	-	-	<i>Agromyces</i> , <i>Clavibacter</i> .
VIII	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Aureobacterium</i> , <i>Curtobacterium</i> .

Note : + : présent; - : absent; V : variable suivant les espèces d'un même genre; Asp : Aspartate; Gly : Glycine; Lys : Lysine; Orn : Ornithine; DAB : Acide diaminobutyrique; DAP : Acide diaminopimélique; Ara : Arabinose; Gal : Galactose; Mad : Madurose; Rha : Rhamnose; Xyl : Xylose.

1.2.3. Lipides membranaires et pariétaux

Les lipides taxonomiquement importants sont représentés par les phospholipides, les ménaquinones, les acides gras et parfois les acides mycoliques.

1.2.3.1. Phospholipides membranaires

Ce sont des lipides polaires présents au niveau des membranes cellulaires. L'analyse de ces composés a permis de distinguer plusieurs genres entre eux et ayant la même morphologie et

le même type pariétal, tels que *Pseudonocardia* et *Amycolatopsis* (Lechevalieret *al.*, 1986), *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (Labedaet *al.*, 1984), etc. D'après Lechevalieret *al.* (1977), on distingue cinq profils phospholipidiques (de PI à PV caractérisés généralement par la présence d'un ou de deux phospholipides caractéristiques) chez les actinobactéries (Tableau 2).

Tableau 2. Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les actinobactéries (Lechevalieret *al.*, 1977).

Type de phospholipide	PE	PC	PG	PGL	Genres représentatifs
PI	-	-	-	v	<i>Actinomadura, Spirillospora, Nocardioides, etc.</i>
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces, Nocardia, Amycolatopsis, kutzneria, Saccharothrix, etc.</i>
PIII	-	+	-	V	<i>Nocardiopsis, Pseudonocardia, Saccharopolyspora, etc.</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Streptosporangium, Planomonospora, Microtetraspora, Nonomuraea, etc.</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia, Promicromonospora, Cellulomonas, etc.</i>

Note: + : présent; - : absent; v : variable selon les genres et les espèces; PE : phosphatidyl-éthanolamine; PC : phosphatidyl-choline; PG : phospholipides contenant de la glucosamine; PGL : phosphatidyl-glycérol. (Toutes les actinobactéries possèdent le phosphatidyl-inositol).

1.2.3.2. Acides gras

Ils sont présents au niveau de la membrane cellulaire. Ces molécules comportent 12 à 20 atomes de carbone et peuvent être saturées ou insaturées. Kroppenstedt (1985) a distingué plusieurs types de profils d'acides gras selon leurs types et leurs pourcentages (Tableau 3) qui, en combinaison avec d'autres critères chimiques, contribuent dans la distinction entre certains genres (Minnikin *et al.*, 1975; Grund et Kroppenstedt, 1990; Kroppenstedt *et al.*, 1990; Rainey *et al.*, 1996; Minnikin *et al.*, 1980 et 1984).

Tableau 3. Profils des acides gras chez les actinobactéries (Kroppenstedt, 1985)

Type du profil	Acide gras							
	Saturé	Insaturé	Iso 14/16/18 carbones	Iso 15/17 carbones	Anteiso 15/17 carbones	10-Méthyl		Cyclopropane
						17 carbones	18 carbones	
1a	+++	+++	-	-	-	-	-	-
1b	+++	+++	-	-	-	-	+	-
1c	+++	+++	-	-	-	-	-	++
2a	++	+	+++	+	±	-	-	-
2b	±	+	++	+++	+	-	-	-
2c	+	v	+++	+	+++	-	-	-
2d	+	+	+++	+++	+++	-	-	-
3a	+++	++	+++	±	±	±	+++	-
3b	+	+	+++	+++	++	++	±	-
3c	+	+	++	+	+	+++	±	-
3d	+	+	+++	++	+++	±	+++	-

Note ; +++ (très présent); ++ (moyennement présent); + (faiblement présent); ± (présent avec un taux inférieur à 5%); v (variable).

1.2.3.3. Ménaquinones

Ce sont des lipides membranaires composés d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne carbonée aliphatique contenant des unités isoprènes. Les ménaquinones des actinobactéries sont partiellement saturés et contiennent de huit à dix unités isoprènes (Kroppenstedt, 1985) à l'exception de deux espèces, *Gordona aurantiaca* et *Corynebacterium paurometabolum* qui contiennent des chaînes isoprényliques complètement insaturées (Goodfellow *et al.*, 1978; Collins et Jones, 1981; Meisel, 1982; Lemmer et Kroppenstedt, 1984). La variation dans la longueur et le degré de saturation 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 (Tableau 4).

Tableau 4. Types des ménaquinones chez les actinobactéries (Kroppenstedt, 1985).

Type	Caractéristique(s)	Ménaquinones principaux	Genres représentatifs
1a	Absence d'unités isoprènes hydrogénées	MK-7	<i>Thermoactinomyces</i> *
1b		MK-9	<i>Gordona</i>
2a	Présence d'un seul type de ménaquinones, souvent dihydrogénées ou tétrahydrogénées avec 8 ou 9 unités isoprènes	MK-8(H ₂)	<i>Rhodococcus</i>
2b		MK-8(H ₄)	<i>Nocardia</i>
2c		MK-9(H ₂)	<i>Mycobacterium</i>
2d		MK-9(H ₄)	<i>Geodermatophilus</i>
3a	Présence de ménaquinonestétrahydrogénées	MK-8(H ₄), MK-9(H ₄)	<i>Saccharomonospora</i>
3b		MK-9(H ₄), MK-10(H ₄)	<i>Actinoplanes</i>
4a	Présence de ménaquinones ayant la même longueur mais avec des degrés de saturation différents	MK-9(H ₂), MK-9(H ₄), MK-9(H ₆)	<i>Microtetraspora</i>
4b		MK-9(H ₄), MK-9(H ₆), MK-9(H ₈)	<i>Streptomyces</i>
4c		MK-10(H ₄), MK-10(H ₆)	<i>Nocardiopsis</i>

*Après les études phylogénétiques, le genre *Thermoactinomyces* (bien que mycélien) est exclu de la classe des *Actinobacteria*.

1.2.3.4. 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 (Mordarskaet *al.*, 1972). Par exemple, *Nocardia* (50 atomes de carbone) et *Corynebacterium* (30 atomes de carbone) possèdent des acides mycoliques (Mordarskaet *al.*, 1972) tandis que *Amycolatopsis* et *Pseudonocardia* n'en contiennent pas.

2. Critères d'identification des espèces

Les critères physiologiques et moléculaires sont les bases de la détermination des espèces.

2.1. Critères physiologiques

L'étude physiologique des actinobactéries contribue à la détermination des espèces appartenant à un même genre. Cette étude permet d'évaluer la capacité des actinobactéries à

dégrader différents composés glucidiques, lipidiques et protéiques, polymères complexes, stéroïdes, etc. et leur tolérance aux certains agents physiques (température et pH), chimiques (chlorure de sodium, phénol, etc.) et/ou biologiques (antibiotiques) en faisant plusieurs tests.

2.2. Critères moléculaires

La taxonomie actuelle exige les analyses moléculaires. Ces techniques sont fiables, rapides et applicables à tout organisme dont l'ADN, l'ARN ou leurs produits (les protéines) peuvent être isolés., et donc elles ont permis de tracer et corriger la position taxonomique de certains genres et espèces déterminés auparavant sur la base des critères morphologiques, physiologiques et chimiques et sont donc obligatoire pour la proposition de nouveaux genres ou de nouvelles espèces. (Fisher *et al.*, 1983; Poschneret *al.*, 1985; Stackebrandt et Kroppenstedt, 1987; Miyadohet *al.*, 1990; Ochi *et al.*, 1993).

Les principales analyses moléculaires utilisées en taxonomie des actinobactéries pour la détermination des espèces reposent sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S et l'hybridation ADN-ADN (Tang *et al.*, 2011). Le pourcentage de G + C est obligatoire uniquement lors de la création de nouveaux genres.

2.2.1. Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S

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). Cette analyse a été introduite dans la taxonomie des actinobactéries par Stackebrandt *et al.* (1981 et 1983).

Le séquençage de l'ADNr 16S commence par l'extraction de l'ADN génomique puis l'amplification de l'ADNr par réaction de polymérase en chaîne (PCR) avec l'utilisation des amorces spécifiques. Par la suite, le produit de la PCR est utilisé pour séquençage. Les séquences obtenues après amplification sont soumises à des études de comparaison (phylogénie) entre elles ou bien avec des espèces de référence répertoriées dans des banques de données génomiques (Labeda et Kroppenstedt, 2000). Cette étude de comparaison nécessite un traitement préalable des séquences nucléotidiques partielles obtenues en général après séquençage et reconstitution de la séquence complète (ou presque complète) de l'ADNr 16S. Ce traitement utilise des outils d'inversion des séquences, d'alignement (ex: Clustal W) et de comparaison avec les banques génomiques (ex: Blast). La banque génomique, Eztaxon, regroupe les séquences de toutes les espèces-types valides des actinobactéries.

L'adhésion d'un nouveau taxon à la classe des *Actinobacteria* est indiquée par des valeurs de similitude des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S supérieures à 80% (Stackebrandt *et al.*, 1997). L'appartenance de plusieurs genres à une famille ou plusieurs familles à un sous-ordre doit être validée par la présence de plus de 95% des séquences de nucléotides « signatures » dans le même groupe (Stackebrandt *et al.*, 1997; Zhiet *et al.*, 2009). Deux espèces sont considérées différentes lorsque le pourcentage de similitude est inférieur à 98,65% (Kimet *et al.*, 2014). Cependant, des espèces ayant des pourcentages de similitude entre 98,65 et 100% peuvent aussi être différentes.

Cette méthode d'analyse a montré aussi la diversité réelle des différents habitats, tel que le sol, en actinobactéries non cultivables par l'étude de l'ADNr 16S présent dans ces habitats (Wawriket *et al.*, 2007).

2.2.2. Hybridation ADN-ADN

Hybridation ADN-ADN est indispensable pour l'identification définitive des espèces, mais elle n'est obligatoire que pour les taxons ayant un pourcentage de similarité de l'ADNr 16S avec les espèces valides, supérieur ou égal au pourcentage limite de la détermination de nouvelles espèces qui est de 98,65% (Kimet *et al.*, 2014). Par cette méthode, le pourcentage de réassociation de l'ADN génomique d'un taxon avec celui des espèces les plus proches est déterminé. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance de l'ADN génomique inférieur à 70% (Wayne *et al.*, 1987).

2.2.3. Détermination du pourcentage de guanine + cytosine

En 1950, Chargaff a montré que le contenu en bases puriques et pyrimidiques de l'ADN peut varier d'un individu à un autre mais est constant pour les individus de la même espèce et alors, l'introduction du pourcentage de guanine + cytosine (% de G + C) dans la taxonomie revient à ce concept. Chez les bactéries, le pourcentage de G+C varie entre 25 et 75%, et la valeur est constante pour un organisme donné (Johnson, 1989). Effectivement, 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. Cependant, des valeurs du pourcentage en G + C identiques n'impliquent pas que les bactéries soient proches entre elles car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN (Euzéby, 2002).

Grâce au % de G + C, la définition des actinobactéries (dont l'ADN contient un taux élevé en G + C, supérieur à 55% (Goodfellow et Cross, 1984)) a été reconsidérée, ceci permettant

de différencier la lignée actinobactériale de celle des *Bacillaceae*, des *Lactobacillaceae* et d'autres bactéries à Gram positif. (Stackebrandt *et al.*, 1981_a; Goodfellow, 1985 et 1989). Encore, il a permis d'inclure dans le phylum des *Actinobacteria* des bactéries à Gram positif qui ne possède pas un mycélium, telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et *Micrococcus* (Stackebrandt et Schumann, 2006; Wellington et Ul-Hassan, 2009) et d'exclure *Thermoactinomyces* qui a été considéré comme une actinobactérie grâce à sa forme mycélienne mais contient un taux en G + C inférieur à 55% (Yoon *et al.*, 2005).

La détermination du pourcentage de G + C doit être effectuée pour la souche-type de l'espèce-type d'un nouveau genre. Par contre, si la nouvelle espèce appartient à un genre déjà décrit, la détermination du pourcentage de G + C de sa souche-type est facultative (Stackebrandt *et al.*, 1997; Euzéby, 2002).

2.2.4. Autres techniques moléculaires

Rarement, d'autres techniques moléculaires sont utilisées dans la taxinomie des actinobactéries par exemple, des méthodes rapides de typage de l'ADN, considérées en majorité comme des variantes de la technique PCR (Vanechoutte, 1996; Rademaker *et al.*, 2000; Gürtler et Mayall, 2001), comme celles visant le génome entier (RFLP) ou des groupes de gènes ("ribotyping") ou encore des gènes individuels (ARDRA) dans la détermination des relations inter- et intra-spécifiques. La méthode ARDRA a été utilisée pour différencier les espèces d'*Actinomadura*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* et *Tsukamurella* (Steingrube *et al.*, 1997; Harvey *et al.*, 2001; Cook et Meyers, 2003). Un autre exemple c'est la technique de l'analyse des protéines ribosomiques par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide qui a montré que l'espèce, *Streptomyces griseolavendus* est un variant de *S. lavendulae* (Ochiet *et al.*, 1993).

3. Description de quelques genres d'actinobactéries

3.1. Genre *Streptomyces*

Selon le manuel de Bergey de 2004, les *Streptomyces* ont été classés dans l'ordre des *Actinomycetales*. Récemment, dans l'édition de 2012, l'ordre des *Actinomycetales* est divisé en plusieurs ordres par Goodfellow *et al.* selon les bases de données moléculaires et donc le genre *Streptomyces* appartient à l'ordre *Streptomycetales* et à la famille *Streptomycetaceae*.

L'identification morphologique de *Streptomyces* constitue la présence d'un MS non fragmenté et un MA aux sporophores formant des chaînes de spores (3 à 10, 10 à 50 ou plus de 50 spores par chaîne) qui peuvent être droites (type SC = Straight chains) à flexueuses (type RF

= *RectusFlexibilis*), en crochets ou en boucles (type L = Loop) ou encore spiralées (type S = *Spira*) (Figure 1). Généralement, les sporophores ne sont pas verticillés à l'exception de certaines espèces.

Les cellules de ce genre contiennent une paroi de type IC (présence de l'isomère LL de DAP avec glycine et absence de sucres caractéristiques) (Holt *et al.*, 1994), les phospholipides membranaires de type PII (Lechevalier *et al.*, 1977) et les acides gras de type ramifiée iso et antéiso, parfois insaturés et cyclopropaniques (Rezenka *et al.*, 1984).

D'après le manuel de Bergey de 2012, le pourcentage en G+C des espèces de *Streptomyces* varie entre 68 et 78%. Le genre *Streptomyces* comporte le plus grand nombre d'espèces, ayant plus de 612 espèces définies sur la base du gène codant pour l'ARN 16S et de l'hybridation ADN-ADN (Labea *et al.*, 2012).

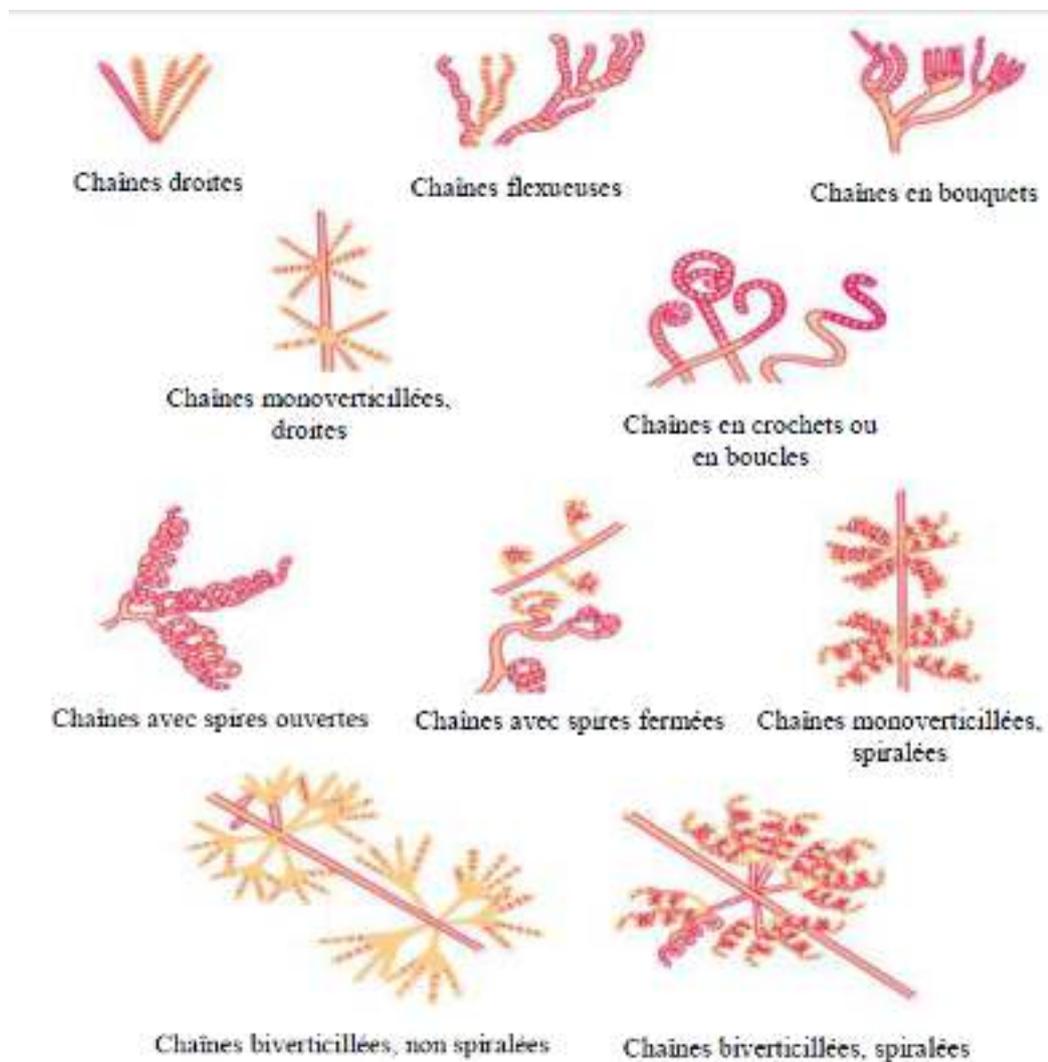


Figure 1. Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de *Streptomyces* (Bergey's Manual, 2012).

3.2. Genre *Streptosporangium*

Streptosporangium est le genre type (Couch, 1955) de la famille des *Streptosporangiaceae* (Goodfellow *et al.*, 1990), le sous-ordre des *Streptosporangineae*, l'ordre des *Streptosporangiales* et la classe des *Actinobacteria*, selon l'analyse de l'ARN16S (Bergey's Manual, 2012). Ce genre se caractérise par la présence dans les cellules du DL-DAP, du madurose, des phospholipides de type PIV ((Stackebrandt *et al.*, 1994), des ménaquinones MK-9(H2) et MK-9(H4), (Quintana et Goodfellow, 2012) et par l'absence d'acides mycoliques.

Les bactéries de ce genre produisent un MS stérile et non fragmenté et un MA de plusieurs spores au niveau des sporanges. Leurs sporanges sont globuleux (5 à 20 µm de diamètre), sessiles ou portés par de courts sporangiophores (10 µm ou moins) et contenant chacun une seule chaîne spiralée de spores non mobiles, rondes à ovoïdes (1 à 2 µm de diamètre) ou plus rarement en bâtonnets droits (1 × 2 µm). La paroi des sporanges est fine, de sorte que les spores sont visibles au microscope optique, avant même leur libération (Figure 2).

Le pourcentage en bases G+C varie entre 69 et 71% (Stackebrandt *et al.*, 1994) et l'espèce type du genre *Streptosporangium* c'est *Sg. Roseum* (Couch, 1955). Ce genre comporte 20 espèces et 2 sous-espèces (He *et al.*, 2014; Intra *et al.*, 2014; Chaabane Chaouchet *et al.*, 2016).

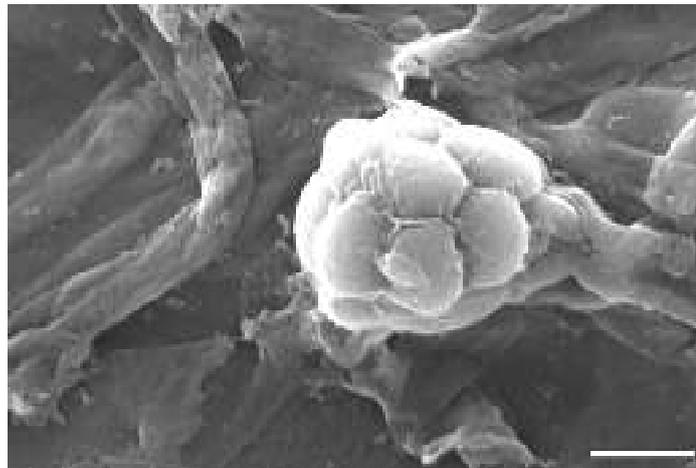


Figure 2. Micrographie de *Streptosporangium saharense* SG20^T (Chaabane Chaouchet *et al.*, 2016).

3.3. Genre *Nocardia*

En 1889, Trevisan a établi le genre *Nocardia* qui a été nommé en hommage à Edmond Nocard (1850–1903), un vétérinaire Français qui a isolé les membres de ce taxon en premier (Bergey's Manual, 2012). Les membres de *Nocardia* sont des actinobactéries ubiquitaires présents surtout dans le sol, non mobiles à acide mycolique (Orchard, 1981; Maldonado *et al.*, 2000). Leur pourcentage de G+C d'ADN varie entre 63 et 72% (Bergey's Manual, 2012). Ce

genre contient 75 espèces (Bergey's Manual, 2012). L'espèce type est *Nocardia asteroides* (Eppinger, 1891; Blanchard, 1896). Plusieurs espèces de ce genre sont des agents de maladies humaines et animales (Wallace *et al.*, 1991; Kageyama *et al.*, 2005; Laskeret *et al.*, 2014). Cependant, certaines espèces produisent des métabolites secondaires (Aoki *et al.*, 1976; Komaki *et al.*, 1999; Igarashi *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2009).

Les membres de *Nocardia* produisent des hyphes aériens qui se fragmentent en éléments coccoïdes ou en bâtonnets (Locci, 1976; Nesterenko *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1976) (Figure 3).

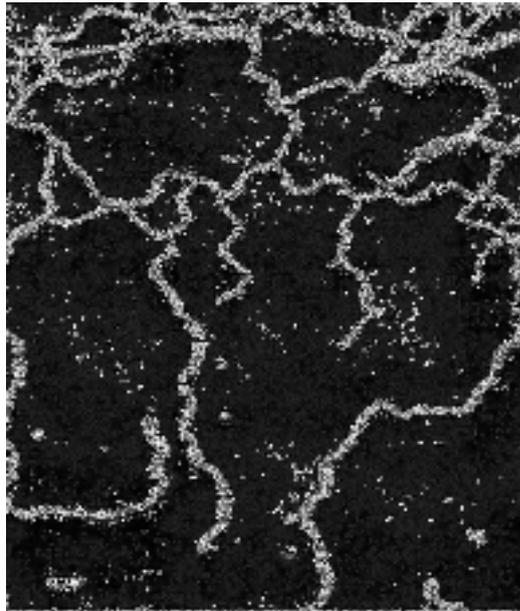


Figure 3. Micrographie de *Nocardia farcinica* IPV2110 (Locci, 1976).

3.4. Genre *Microbispora*

Les membres de ce genre produisent des spores en paires longitudinales au niveau des hyphes aériens courts (Figure 4) ou au niveau des sporophores courts à l'exception de *M. mesophila* JCM 3151^T (Nonomura et Ohara, 1971; Zhang *et al.*, 1998) et *M. thailandensis* NN276^T (Duangma *et al.*, 2012) qui produisent des spores uniques.

Chimio-taxonomiquement, ce genre est caractérisé par la présence de DAP (Bergey's Manual, 2012), madurose sauf chez *M. hainanensis*, des ménaquinones majeurs MK-9(H₀), MK-9(H₂) et MK-9(H₄) et du phospholipide membranaires PIV (Han *et al.*, 2016).

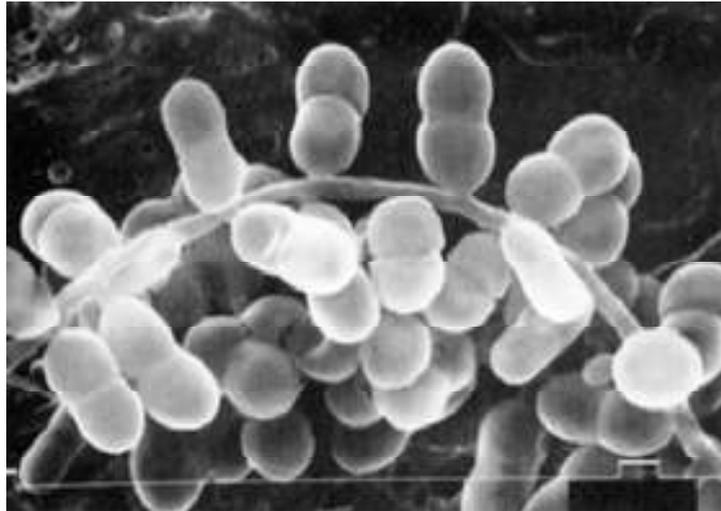


Figure 4. Micrographie de *Microbisporarosea* ATCC 12950^T (Nonomura et Ohara, 1957).

Le genre *Microbispora* a été proposé en premier d'être dans la famille de *Streptosporangiaceae* par Nonomura et Ohara en 1957 et corrigé par Zhang *et al.*, en 1998. Actuellement, il contient 9 espèces et 2 sous-espèces (Nonomura et Ohara, 1960; Miyadohet *al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 1999; Boondaenget *al.*, 2009; Duangmalet *al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). *M. rosea* est la souche-type de ce genre (Nonomura et Ohara, 1957).

3.5. Genre *Nocardiopsis*

Le genre *Nocardiopsis* appartient de la famille des *Nocardiopsaceae* (Rainey *et al.*, 1996). Les espèces de ce genre produisent de longs hyphes formant un mycélium de substrat plus ou moins fragmenté. Le mycélium aérien peut être droit à flexueuse ou anarchique en zig-zag au début de la sporulation, se fragmentant complètement pour former des chaînes de spores de tailles variables (Meyer, 1976) (Figure 5). La paroi cellulaire est de type IIIC et les phospholipides membranaires sont de type PIII (phosphatidylcholine). Le taux de G + C est compris entre 64 et 71%. La majorité des espèces du genre *Nocardiopsis* sont halophiles ou halotolérantes (Yassin *et al.*, 1993; Al Tain et Ruan, 1994; Li *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009) et l'espèce-type est *Nocardiopsis dassonvillei* (Brocq-Rousseau, 1904; Meyer, 1976).

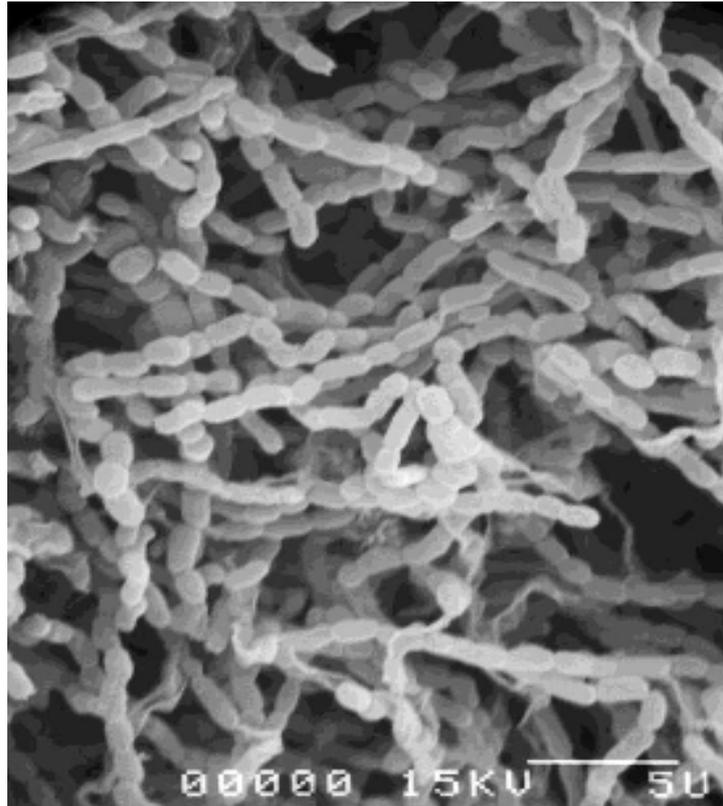


Figure 5. Micrographie de l'isolat H18 de *Nocardia* sp. (Meklat, 2012).

3.6. Genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* a été décrit par Labeda *et al.* (1984) avec *S. australiensis* comme espèce-type. Cette espèce fut classée originalement dans la famille des *Pseudonocardiaceae* (Embley *et al.*, 1988), puis dans celle des *Actinosynnemataceae* sur la base des parentés phylogénétiques (Labeda et Kroppenstedt, 2000). Ce genre se caractérise par la présence d'un mycélium aérien abondant ou très peu de longues chaînes de spores ovoïdes ou en bâtonnets non mobiles, issues de la fragmentation anarchique des filaments du mycélium aérien (Figure 6) et du mycélium du substrat en éléments coccoïdes (Labeda et Kroppenstedt, 2000). Sa paroi cellulaire est de type III E (Labeda, 1987; Labeda et Kroppenstedt, 2000; Labeda *et al.*, 2001). Les acides mycoliques pariétaux sont absents. Les phospholipides membranaires sont du type PII ou du type PIV (Lechevalier *et al.*, 1977). Les ménaquinones prédominants sont de type MK-9(H₄) ou MK-10(H₄).

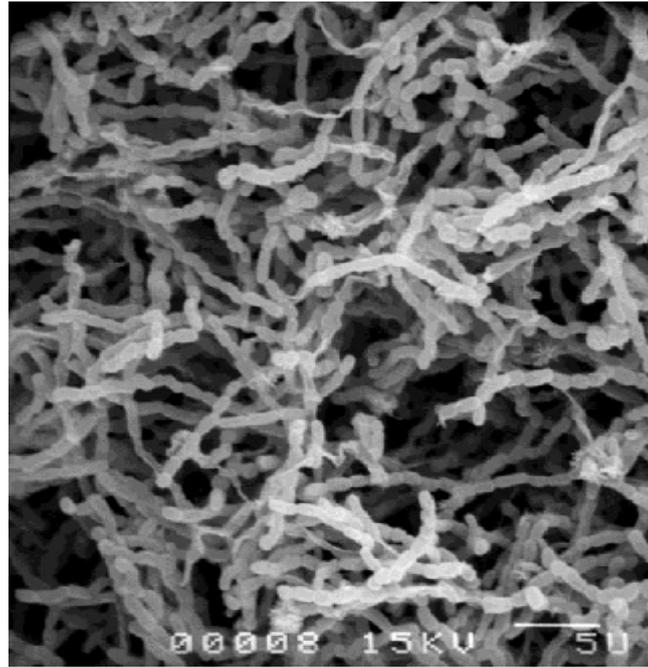


Figure 6. Micrographie de *Saccharothrix saharensis* (Boubetraet *al.*, 2013)

II. IMPORTANCE DES ACTINOBACTERIES

Parmi les 22000 produits bioactifs, plus de 10 000 molécules sont issus des actinobactéries (Soleckaet *al.*, 2012) et parmi ses genres, on peut estimer que 75% (7600) de ces métabolites sont produits par *Streptomyces*. La diversité métabolique des actinobactéries est due à leur génome extrêmement important, possédant des centaines de facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes, leur permettant ainsi de répondre aux besoins spécifiques (Goshiet *al.*, 2006).

1. Dans le domaine agronomique

Certaines actinobactéries peuvent développer des interactions symbiotiques avec les plantes cultivées et favorisent leur croissance à travers différents mécanismes (El-Tarabilyet *al.*, 2009; Ilicet *al.*, 2010). Ces bactéries bénéfiques sont désignées par PGPB "Plant Growth Promoting Bacteria" (Kloepper et Schroth, 1978), PGPR "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (Kloepper et Schroth, 1978), EPR "Emergence Promoting Rhizobacteria" (Kloepperet *al.*, 1986) ou YIB "Yield Increased Bacteria" (Chen *et al.*, 1996). Plusieurs souches et espèces d'actinobactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Microbispora*, etc., ont été décrites comme endophytes à effet PGPR (Solanset *al.*, 2009).

- La biodégradation et la transformation de la matière organique; Les actinobactéries peuvent dégrader les substances organiques récalcitrants et difficilement ou non biodégradables par les autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, la chitine et les lignocelluloses, grâce à leur potentiel enzymatique riche (ligninases, cellulases, xylanases, amylases, protéases et chitinases) (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Goodfellow *et al.*, 1984).
- Ils sont efficaces pour la lutte biologique contre les agents phytopathogènes d'origine tellurique ou foliaire (Crawford *et al.*, 1993; El-Tarabily *et al.*, 2010; Toumatia, 2010) Ces deux dernières décennies, les méthodes de lutte biologique sont de plus en plus envisagées dans la production agricole comme une alternative aux fongicides chimiques pour le biocontrôle des champignons phytopathogènes dans le sol (Elliott *et al.*, 2009) par exemple certaines espèces du genre *Streptomyces* contre *Phytophthora fragariae* (Valois *et al.*, 1996), *Sclerotinia homeocarpa* (Trejo-Estrada *et al.*, 1998), *Gaeumannomyces graminis* (Chamberlain et Crawford, 1999), *Pythium ultimum* (Castillo *et al.*, 2002), *Rhizoctonia solani* (Patilet *et al.*, 2010) et *Fusarium culmorum* (Yekkouret *et al.*, 2012). Les mécanismes de ce contrôle peuvent être par :
 - ❖ Production des enzymes qui dégradent la paroi des cellules fongiques (El-Tarabily et Sivasithampar, 2006; Errakhiet *et al.*, 2007; Jain et Jain, 2007) comme des chitinases et des glucanases contre *Fusarium oxysporum* (El-Tarabily *et al.*, 1997; Sabaouet *et al.*, 1998; Schotte *et al.*, 2001; Ramos-Solano *et al.*, 2010).
 - ❖ Production des antibiotiques qui leur permettent d'inhiber les agents phytopathogènes (Barakate *et al.*, 2002; El-Tarabily et Sivasithampar, 2006) par exemple les antifongiques nigrecine, geltanamycine et guanidylfingine chez *S. violaceus niger* YCED9 (Tréjo-Estrada *et al.*, 1998).

Ces agents naturels sont réunis sous le concept de biopesticides (Upadaya et Mukerji, 1999). L'utilisation des actinobactéries comme biopesticide nécessite la préparation convenable de grandes quantités d'inoculum qui peut être stocké sans perdre sa viabilité (Clark *et al.*, 1995). Actinovate®, Actino-iron® et Mycostop® sont des exemples des biopesticides actinobactériens (Strap, 2011).

- Ils sont également capables de dégrader ou de transformer certaines toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et réduire ainsi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (Holzapfelet *al.*, 2002).
- Solubilisation des complexes phosphatés; En dépit d'étant le deuxième élément essentiel pour les plantes après l'azote, le taux des phosphates assimilables est très faible dans le sol (Gyanshwaret *al.*, 2002) due à leurs fortes réactivités avec le calcium, le fer et l'aluminium. La synthèse de phosphatase et d'acides organiques par certaines actinobactéries a été rapportés pour sa contribution dans cette solubilisation (Mbaet *al.*, 1997; Hamdali et *al.*, 2008).
- Production de phytohormones comme l'acide 3-indol-acétique (AIA) et la gibbérelline (Khamna *et al.*, 2009; Solanset *al.*, 2011); L'AIA stimule la germination des graines de tomate, l'élongation racinaire et la croissance des plantes (El-Tarabily et *al.*, 2009).

2. Dans les domaines médico-vétérinaire et industriel

Les actinobactéries produisent de nombreuses molécules bioactives qui sont exploitées pour la thérapie humaine et animale (Solankiet *al.*, 2008) ;

- particulièrement des antibiotiques telles que les antifongiques comme amphotéricine B qui est produit par *Streptomyces nodosus* (Caffrey et *al.*, 2001) et les antibactériens comme daptomycine qui est produit par *Streptomyces roseosporus* (Wezelet *al.*, 2006).
- des antiparasitaires comme les antimalaria (ex. distamycine), les acaricides (ex. altémicidine) et les anticoccidiens (Lombardi et Crisanti, 1997; Rättyet *al.*, 2002) les insecticides (ex. mikkomycine), les miticides (ex. tétranactine), les antihelminthiques (ex. avermectines) et les piscicides (ex. antimycine A) (Stapley, 1982; Demain, 1999).
- des enzymes et des vitamines (Sanglier *et al.*, 1993; Takahashi et Omura, 2003).
- des substances à propriétés antitumorales et cytostatiques ex. carcinostatine, des antimitotiques ex. ansamitocine, des antihistaminiques, des analgésiques, des vasodilatateurs, des inhibiteurs enzymatiques, des immunostimulants et des immunosuppresseurs (Tsuboya et *al.*, 1996; Demain, 1999).

En médecine vétérinaire, certaines molécules comme la spiramycine sont utilisées dans l'élevage industriel des animaux comme additif nutritionnel (Schwarz *et al.*, 2001).

Certaines enzymes dérivées des actinobactéries sont utiles dans l'industrie alimentaire comme la glucose isomérase et dans la production des détergents comme les protéases (Moreira *et al.*, 2002).

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

Le matériel que nous avons utilisé consiste en:

- 16 souches d'actinobactéries isolées par Meklat (travaux en cours) à partir de 8 sols sur 4 milieux sélectifs en ajoutant des antibiotiques aux milieux de base chitine vitamine B:actidione seul (M1), actidione+ rifampicine (M2),actidione +acide nalidixique(M3) etactidione + pénicilline (M4) (Tableau 5).

Tableau 5.Provenance des isolats d'actinobactéries et les milieux d'isolement.

Sol	Milieux et isolats			
	Milieu M1	Milieu M2	Milieu M3	Milieu M4
A	A3' et A4'	A4, A9 et A12	A8	A1
B	-	B4	-	-
C	-	-	C8	-
D	D8	-	-	D1
E	-	-	-	E2
F	-	-	F3	-
G	-	-	G3	-
H	-	H3 et H4	-	-

- 8 germes cibles provenant de la collection du laboratoire de biologie des systèmes microbiens(Tableau 6).

Tableau 6. Germes cibles utilisés.

Groupe	Souche
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline (MRSA)
Bactéries Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Champignon	<i>Fusariumculmorum</i>
	<i>Umbelopsisramanniana</i>
	<i>Aspergillus carbonarius</i>
Levure	<i>Candida albicans</i>

II. METHODES

1. Repiquage et suivi de la croissance des isolats

Les isolats d'actinobactéries étaient conservés dans des tubes inclinés à 4°C. La revivification de ces isolats a été réalisée par le transfert d'inoculum à partir de ces tubes sur le milieu International *Streptomyces* Project 2 (ISP2) (Shirling et Gottlieb, 1966) coulé en boîtes de Pétri (voir composition dans le tableau 8). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C pendant 10 jours. La croissance de chaque isolat a été observée et appréciée chaque deux jours pour déterminer le temps minimum nécessaire pour l'obtention d'une bonne croissance.

2. Étude taxonomique

2.1. Préparation des cultures

Les 16 isolats étudiés ont été repiqués par la technique en strie sur les milieux ISP1, ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966), Gélose Nutritive (GN) (Waksman, 1961) et Bennett (Warren *et al.*, 1955) puis incubés à 30°C pendant 3 semaines (Tableau 7).

Tableau 7. Constituants des milieux de culture; Bennett, GN, ISP1 et ISP2, préparés pour l'étude morphologique.

Milieux	Constituants (en grammes par 1000ml de l'eau distillée)
Bennett	10g de glucose; 2g de peptone de caséine; 1 g d'extrait de levure; 1g d'extrait de viande; 20g d'agar. pH 7,2
GN	5g de peptone caséine; 2g d'extrait de levure; 1 g d'extrait de viande; 5g de NaCl; 20g d'agar. pH 7,2
ISP1	5g de tryptone; 3 g d'extrait de levure; 20g d'agar. pH 7,2
ISP2	4 g de glucose; 4 g d'extrait de levure; 10g d'extrait de malt; 20g d'agar. pH 7,2

Note ; tous les milieux doit être stérilisés dans l'autoclave après leur préparation.

2.2. Caractérisation micromorphologique

Pour reconnaître leurs genres, l'étude micromorphologique des isolats est une étape indispensable qui est effectuée en utilisant un microscope optique. Pour les études détaillées, dans quelques cas, le microscope électronique est utile.

2.2.1. Observations au microscope photonique

Les isolats ont été étudiés au microscope photonique (model B1; Motic) aux grossissements $\times 100$ et $\times 400$ pour observer la sporulation ou non du mycélium aérien (MA), la fragmentation ou non du mycélium du substrat (MS) et autres caractéristiques particulières. L'observation est réalisée sur l'un des milieux qui a donné une meilleure croissance. Cette observation est *in situ* pour éviter l'altération des structures en place tel que le mycélium et les fructifications.

2.2.2. Observations au microscope électronique

Des cubes de 1 cm^3 ont été coupés à partir des cultures pures ayant une bonne croissance et sporulation de certains isolats représentatifs de quelques genres puis séchés à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant une nuit. Les échantillons séchés ont été envoyés au laboratoire de génie chimique de Toulouse pour la suite de la préparation des échantillons (métallisation avec l'or) et l'observation au microscope électronique (model JSM-7100F; JOEL).

2.3. Caractérisation macromorphologique des isolats

L'étude macromorphologique a pour but d'observer et de noter la croissance des isolats sur les quatre milieux ensemencés (ISP1, ISP2, GN et Bennett) et également, la couleur du mycélium aérien, du mycélium du substrat et celle des pigments solubles dans les milieux si présent à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color: ISCC-NBS) (Shirling et Gottlieb, 1966).

La lecture a été faite par observation à l'œil nu après 3 semaines d'incubation à $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.4. Caractérisation physiologique des isolats

Un total de 31 tests physiologiques a été réalisé pour chacun des isolats étudiés.

2.4.1. Tests de dégradation effectués par la technique d'ensemencement par point

Un inoculum de colonies visible à l'œil nu d'un isolat est ensemencé par point sur chaque milieu de culture test et incubée à $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Après incubation, l'observation d'une auréole claire ou opaque autour des colonies avec ou sans ajout de réactif indique la dégradation du composant

dans le milieu (Tableau 8). Les tests effectués sont ; la dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1973), des hétérosides (l'arbutine et l'esculine) (Marchal et Bourdon, 1987), de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974), de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1973), de Tween 80 (Sierra, 1957) et des composés azotés (l'adénine, la guanine, l'hypoxanthine, la tyrosine et la xanthine) (Goodfellow, 1971; Gordon *et al.*, 1974). La composition des milieux de culture, leurs préparations et la lecture des résultats sont indiqués dans le tableau 8.

Tableau 8. Composition et préparation du milieu de culture pour chaque test et la mise en évidence de la dégradation.

Test	Milieu de culture		Mise en évidence de la dégradation
	Composition	Préparation	
Composés azotés : adénine, guanine, hypoxanthine, tyrosine et xanthine	0,4 g du composé (0,2 g pour guanine) ; 10 ml de l'eau distillée ; 100 ml du milieu GN	Une suspension stérilisée séparément d'une base azotée est ajoutée aseptiquement au milieu GN stérile, maintenu en surfusion à 50 °C	Auréole claire autour des colonies
Tween 80	1g de NaNO ₃ ; 5g d'extrait de levure; 50ml de *solution saline; 0,1g de CaCl ₂ , 2H ₂ O; 10ml de Tween 80 et 18g d'agar par 1000ml d'eau distillée	Les ingrédients sont mélangés, le pH est réglé à 7,2 et l'ensemble est stérilisé dans l'autoclave	Auréole opaque autour des colonies
Gélatine	4g de gélatine ; 100ml de milieu GN	Mélange des ingrédients et stérilisation dans l'autoclave	Auréole claire autour des colonies après l'ajout du réactif de Frazier
Amidon	10g d'amidon ; 100ml de milieu GN		Auréole transparente autour des colonies après l'ajout d'une solution de Lugol. Le milieu environnant l'aurole porte une coloration bleu-noire
Caséine du lait	Solution 1 (10g de lait en poudre écrémé dissous dans 100ml d'eau distillée) ; solution 2 (150g de NaCl et 3,6g d'agar dans 100 ml d'eau distillée)	Les deux solutions à pH 7,5 sont stérilisées séparément dans l'autoclave puis mélangées aseptiquement	Auréole claire autour des colonies

Arbutine et esculine	1g d'arbutine (ou esculine); 1g de citrate de fer ammoniacal; 10g de peptone et 18g d'agar dans 1000ml d'eau distillée	mélange des ingrédients puis ajustement du pH à 7,2 puis stérilisation dans l'autoclave	Présence d'un pigment brun à noir autour des colonies
-----------------------------	--	---	---

*La solution saline est composée de 0,25g de K_2HPO_4 ; 0,125g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 150g de NaCl; 0,001g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et 0,001g de $MnSO_4$ dans 50 ml de eau distillée.

2.4.2. Tests effectués par la technique d'ensemencement par stries

Pour déterminer s'ils sont capables d'utiliser quelques glucides comme seule source de carbone (Gordon *et al.*, 1974), chaque isolat est ensemencé par stries sur 20 milieux de culture, chacun contient un seul glucide. Un témoin négatif (sans glucide) est réalisé pour chaque isolat. Après incubation à 30 °C, la croissance est estimée par rapport au témoin négatif et le virage au jaune ou non de la couleur du milieu est noté.

La préparation de ces milieux est comme suit:

- Préparation et stérilisation du milieu de base qui est constitué de 1 g de $(NH_4)_2 HPO_4$; 0,5 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et 20 ml de solution aqueuse de rouge de phénol (0,04%) pour 1000 ml d'eau distillée (pH 8).
- Préparation des solutions des glucides à partir de l'eau distillée stérile à raison de 10 g/l du milieu pour chaque glucide.
- Mélange aseptique de chaque solution de glucide (stérilisation par des filtres de 0,22 μm) avec un volume du milieu de base (pour avoir une concentration de 10g/l).

Les sucres testés sont D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-lactose, D-mannitol, D-mannose, D-melezitose monohydrate, D-melibiose, D-raffinose, D-ribose, D-salicin, D-sorbitol, D-tréhalose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose monohydrate, maltose, meso-erythritol et meso-inositol.

2.4.3. Calcul de coefficient de Sokal et Michener

Le degré de similarité entre les souches appartenant au même genre est calculé par l'utilisation de l'indice de Sokal et Michener (simple matching coefficient). Cet indice est le plus utilisé par les taxonomistes qui séparaient souvent deux espèces entre elles par un niveau de similarité compris entre 80 et 85%.

- L'indice de Sokal et Michener tient en compte les similarités positives et négatives entre deux souches données. Sa formule est la suivante:

$$SM_{A,B} = \frac{SM_+ + SM_-}{SM_+ + SM_- + D}$$

$SM_{A,B}$ = indice de similarité entre les souches A et B.

SM_+ = nombre de tests positifs, similaires entre A et B.

SM = nombre de tests négatifs, similaires entre A et B

D = nombre de tests différents entre A et B.

2.5. Caractérisation moléculaire des isolats

2.5.1. Extraction de l'ADN génomique

À partir des cultures des isolats ensemencés en stries bien espacées sur milieu ISP2, des colonies bien isolées sont aseptiquement prélevées à l'aide de cure-dents stériles et transférées dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml, l'ADN est extrait selon la méthode de Liu *et al.* (2000):

- a) Addition de 500µl d'une solution de lyse qui est composée de 400mM de tris-HCl [pH 8], 60mM d'EDTA [pH 8], 150 mM de NaCl et 1% de sulfate de sodium dodecyl (SDS), écrasement du mycélium à l'aide de cônes stériles et incubation à température ambiante pendant 15minutes.
- b) Ajout de 150µl d'une solution à pH 4,8 composée d'acétate de potassium à 5M et de 11,5% d'acide acétique glacial au mélange. L'ensemble est vortexé brièvement et centrifugé à 12000g pendant une minute.
- c) Récupération de 400µl du surnageant dans un autre tube Eppendorf stérile. Addition d'un même volume d'isopropanol (400µl), mélange bref par inversion et puis, centrifugation à 12000g pendant 2 minutes. Le nouveau surnageant est éliminé.
- d) Lavage du culot obtenu dans 300µl d'éthanol à 70% par centrifugation 12000g pendant une minute.
- e) Ce culot (l'ADN extrait) est séché à température ambiante pendant une nuit et puis, suspendu encore dans 40µl d'eau distillée stérile qui est conservé à -20°C.

2.5.2. Amplification et séquençage

Les extraits d'ADN des souches étudiées ont été envoyés au laboratoire de génie chimique de Toulouse (France) pour la réalisation de l'amplification par PCR et le séquençage. Les étapes de ces processus sont illustrées dans la figure 7.

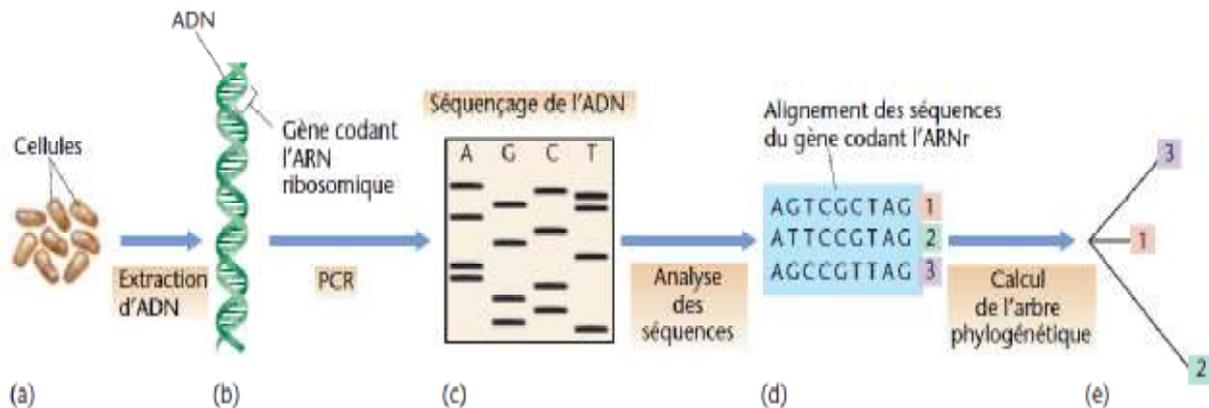


Figure 7. Séquençage et phylogénie du gène de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S); (a) L'ADN est extrait de cellules issues d'une culture pure d'actinobactéries. (b) Le gène codant l'ARNr 16S est spécifiquement amplifié par la technique d'amplification en chaîne par polymérisation (PCR). (c) Le gène est séquencé. (d) Les séquences obtenues sont alignées par un logiciel informatique. (Prescott et Sherwood, 2013)

2.5.3. Étude phylogénétique des souches

Après extraction de l'ADN génomique et amplification et séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, les deux séquences obtenues sont traitées à l'aide d'un logiciel informatique MEGA 6.0 (MolecularEvolutionaryGeneticsAnalysis program, version 6.0) pour obtenir une seule séquence qui représente le gène codant pour l'ARNr 16S ; la séquence sens (5'P - 3'OH) est alignée avec le complément de la séquence anti-sens (3'OH-5'P) pour obtenir une zone de chevauchement (représentée en rouge dans la figure 8). Les deux séquences sont ensuite fusionnées en éliminant la séquence de chevauchement de l'un des brins (Figure 8).

Alignement

5'P ————— 3'OH (brin sens)

5'P ————— 3'OH (complément du brin anti-sens)



Fusionnement

5'P ————— 3'OH (séquence finale)

Figure 8. Illustration de l'obtention de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S à partir des deux séquences obtenues par le séquençage.

Cette séquence du gène codant pour l'ARNr 16S construite est comparée avec celles des souches de référence présentes dans la banque de données GenBank par l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en utilisant le site EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net>) pour déterminer l'espèce la plus proche de la souche étudiée en termes de pourcentage de ressemblance.

Les séquences d'ARNr 16S des souches de références obtenues auxquelles les souches d'actinobactéries sont plus proches sont alignées par l'outil MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) pour faire l'analyse phylogénétique avec le logiciel MEGA 6.0. Des arbres phylogénétiques ont été déduits pour les souches de chaque genre par la méthode statistique du 'neighbor-joining' (Saitou et Nei, 1987). La validation statistique des liens phylogénétiques établis a été effectuée par le test du 'Bootstrap' dont les valeurs sont basées sur le résultat de 1000 analyses (Felsenstein, 1981). Les substitutions ont été effectuées par le modèle de 'Kimura 2-parameter' (Kimura, 1980).

3. Étude de l'activité antagoniste des souches d'actinobactéries

3.1. Évaluation du potentiel antagoniste des isolats sur un milieu complexe

L'activité antagoniste des souches étudiées a été évaluée sur le milieu ISP2 contre 8 germes cibles: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Umbelopsis ramanniana*, *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum* et *Candida albicans*. Ce test a été réalisé par la méthode des cylindres d'agar selon les étapes suivantes (Figure 9):

- a) Ensemencement des souches d'actinobactéries en stries serrées homogènes sur le milieu ISP2 solide (18 g d'agar/l) stérile et incubation à 30 °C pendant 15 jours.
- b) Préparation des suspensions des germes cibles à partir de cultures jeunes dans l'eau distillée stérile contenant dans des tubes à vis (concentration qui permet d'obtenir des colonies juxtaposées non confluentes). Les suspensions sont conservées à 4 °C.
- c) Inoculation aseptique du milieu ISP2 semi-solide (12 g d'agar/l) stérile avec les germes cibles à raison de 1 µl de la suspension par 1 ml du milieu et homogénéisation avant d'être coulé dans les boîtes de Pétri stériles à raison de 20 ml par boîte.
- d) Coupure aseptique des cylindres d'agar de diamètre de 10 mm, à partir des boîtes des actinobactéries, après la durée d'incubation, à l'aide d'un emporte-pièce stérile.
- e) Dépôt des cylindres à la surface du milieu ISP2 inoculé avec les germes cibles et réfrigération à 4 °C pendant 2 h pour permettre la diffusion des antibiotiques dans le milieu et empêcher momentanément la croissance des germes cibles.

- f) Incubation dans l'étuve à 30 °C pendant 24 à 48 h pour les bactéries et 48 à 72 h pour les champignons.
- g) Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition autour des cylindres sont mesurés à l'aide d'une règle.

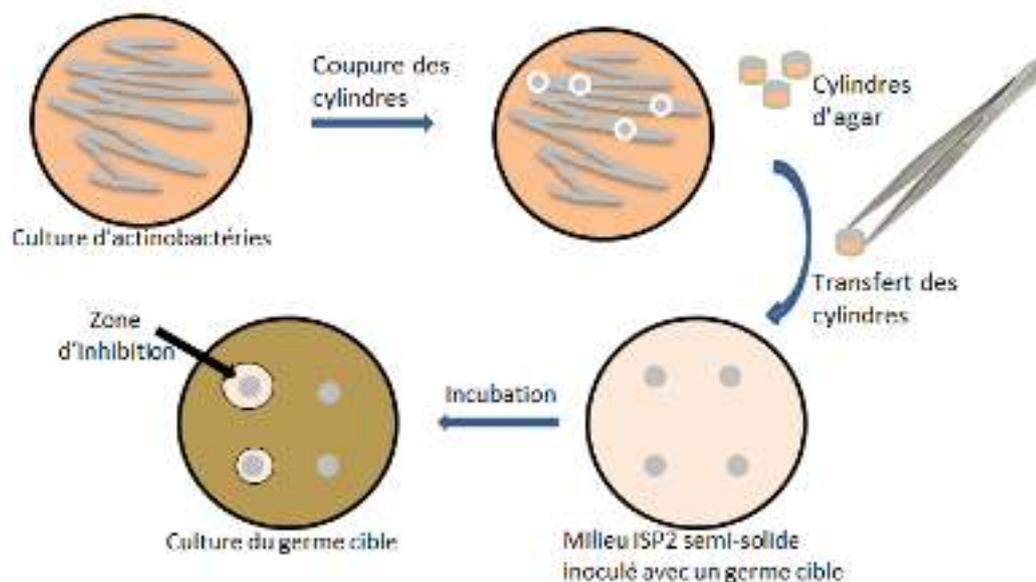


Figure 9. Illustration des étapes de la méthode des cylindres d'agar.

3.2. Étude du potentiel antagoniste des souches dans un milieu synthétique en variant les sources de carbone

Cette étude a pour but de déterminer les glucides qui potentiellement favorisent la production des antibiotiques par les souches d'actinobactéries. Les cylindres d'agar utilisés ont été coupés à partir des cultures des 16 souches d'actinobactéries poussées (résultats positifs) sur les milieux des tests de l'utilisation de glucide comme seule source de carbone après 15 jours d'incubation à 30 °C.

Les microorganismes cibles utilisés pour l'étude sont ceux qui ont montré une sensibilité vis-à-vis des souches d'actinobactéries étudiées lors des tests sur le milieu complexe (*B. subtilis*, MRSA, *C. albicans* et *F. culmorum*).

Après incubation dans l'étuve à 30 °C pendant 24 à 48 h pour les bactéries et 48 à 72 h pour les champignons, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et les comparaisons entre les résultats ont été effectuées pour chaque souche.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOBACTERIES

1. Évaluation de la croissance des actinobactéries sur le milieu ISP2 solide

Les 16 isolats d'actinobactéries étudiées ont été ensemencés sur le milieu ISP2 solide et la croissance a été notée chaque 2 jours pour estimer le temps nécessaire pour l'obtention d'une bonne croissance. La majorité des isolats ont montré une croissance moyenne après 4 jours d'incubation. Cependant, certains isolats (A1, D1 et C8) ont une croissance très lente qui débute après 6 jours d'incubation. La meilleure croissance (maximale) des isolats étudiés est obtenue après 8 jours d'incubation (Tableau 9).

Tableau 9. Suivi de la croissance des isolats d'actinobactéries.

Jour	A1	A3'	A4	A4'	A8	A9	A12	B4	C8	D1	D8	E2	F3	G3	H3	H4
2	-	±	+	+	++	±	+	±	-	-	+	++	++	++	+	++
4	±	++	++	++	+++	+	++	+	±	±	+	+++	+++	+++	++	+++
6	+	++	++	++	+++	++	+++	++	+	+	++	+++	+++	+++	++	+++
8	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
10	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++

2. Caractérisation des isolats d'actinobactéries

2.1. Étude morphologique

2.1.1. Caractérisation micromorphologie

L'observation au microscope optique ou électronique des isolats étudiés a montré une diversité dans la collection des actinobactéries étudiées.

Neuf isolats, ont développé des mycelia de substrat non fragmentés et des mycelia aériens avec de longues chaînes de spores en spirale (type S) pour les souches A4, A12, G3 et H4 en boucles (type L) pour les souches A8, C8 et D1 et droites (type SC) à flexueuses (type RF) pour les souches A3' et A4' ce qui correspond aux caractéristiques du genre *Streptomyces* (Figures 10 et 11).

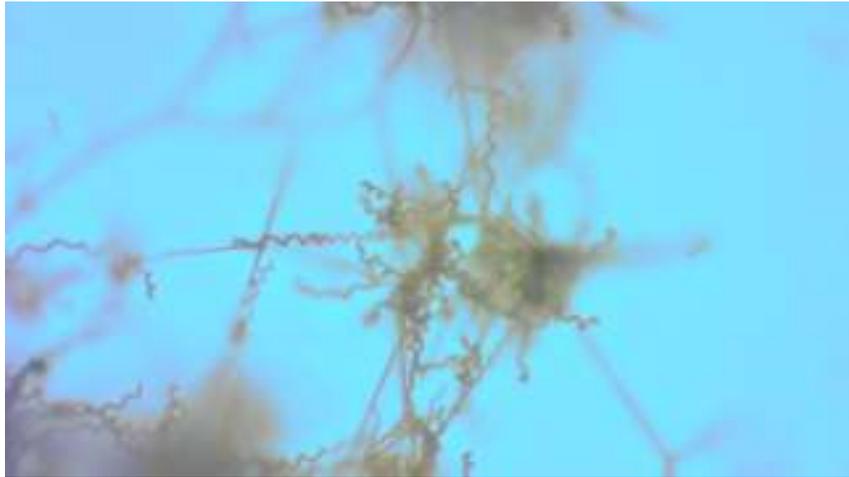


Figure 10. Micrographie la souche A12 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).



Figure 11. Micrographie de la souche A3' observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).

Trois isolats (A1, A9 et H3) ont montré sur le mycélium aérien des sporangiophores qui portent des sporanges globuleux. Le mycélium de substrat est stérile et non fragmenté. Ces caractéristiques sont ceux du genre *Streptosporangium* (Figure 12).

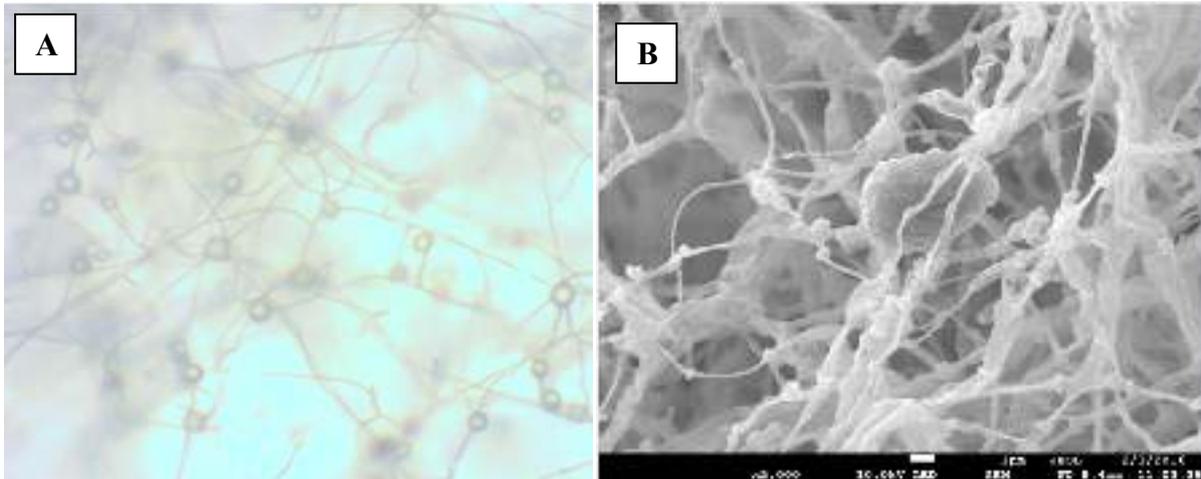


Figure 12. Micrographie de la souche H3 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (A) et au microscope électronique (B) (x 400 plus effet de zoom).

Une souche (B4) possède des spores en paires portés longitudinalement par de courts sporophores sur le MA (Figure 13). Cette souche est rattachée d'une manière présumptive au genre *Microbispora*.

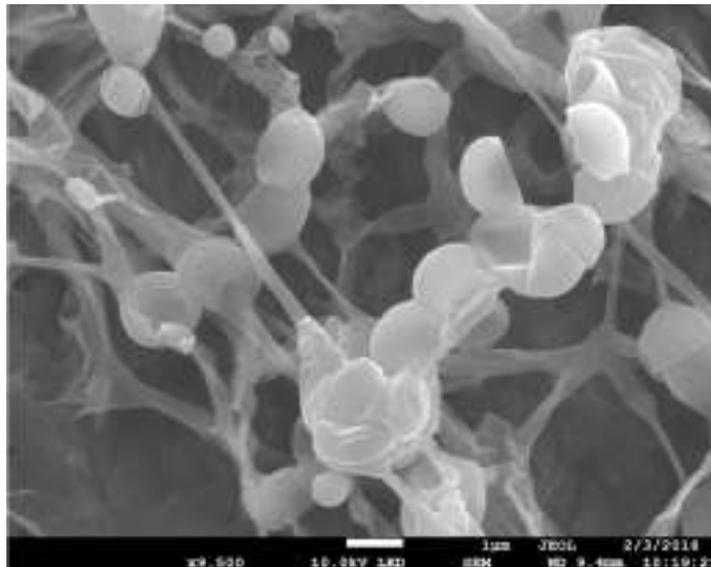


Figure 13. Micrographie de la souche B4 observée au microscope électronique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation.

Une souche (E2) a montré un mycélium de substrat en zig-zag, ramifié avec de courtes chaînes de spores (Figure 14) ce qui nous laisse penser au genre *Nocardia*.

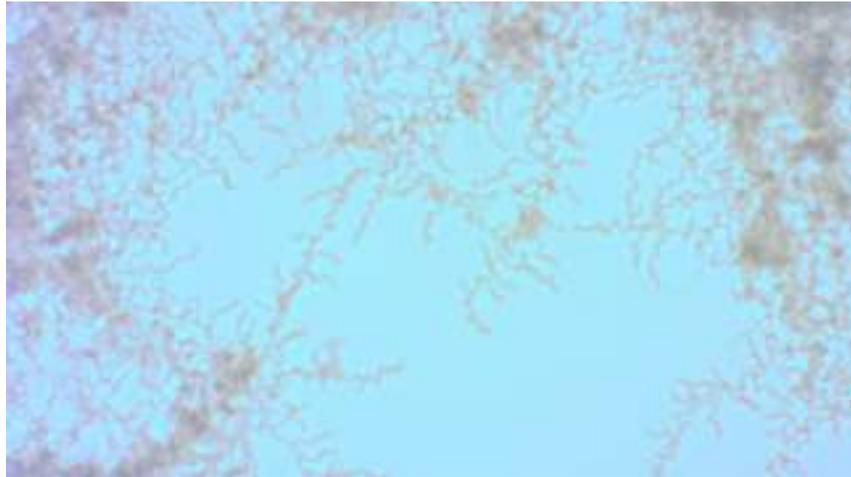


Figure 14. Micrographie de la souche E2 observée au microscope optique (x 400 plus effet de zoom).

Une souche nommée D8 contient un mycélium de substrat non fragmenté et un mycélium aérien fragmenté en courtes chaînes de spores (Figure 15). Cette souche n'a pas pu être rattachée à un genre bien déterminé.



Figure 15. Micrographie de la souche D8 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).

Une souche désignée F3 a montré des chaînes de spores moyennes légèrement en zig_zag regroupés en touffes (Figure 16). Ces caractéristiques nous laissent penser aux genres *Nocardiopsis* ou *Saccharothrix*.



Figure 16. Micrographie de la souche F3 observée au microscope optique sur milieu ISP2 après 3 semaines d'incubation (x 400 plus effet de zoom).

2.1.2. Caractérisation macromorphologique

Chacun des 16 isolats a été repiqué sur 4 milieux de culture solides ; Bennett, GN, ISP1 et ISP2. La croissance et la couleur du mycélium aérien (MA), du mycélium du substrat et des pigments solubles présents ont été notées après 3 semaines d'incubation à 30 °C.

Toutes les souches étudiées ont poussé sur tous les milieux de culture testés à l'exception de la souche A3' qui n'a pas poussé sur le milieu GN. Les milieux ISP2 et Bennett ont permis la meilleure croissance des souches. Cependant, la croissance sur les milieux GN et ISP1 était moyenne. Les mycelia ont produit des couleurs divers dépendants de la souche et du milieu de culture testé. Le mycélium aérien a été abondant pour la plus part des isolats. Des pigments solubles de couleur brune claire dans le milieu ont été observés seulement chez trois souches (A3', A4 et A4') (Tableau 10).

Les différentes souches appartenant au même genre ont donné des couleurs différentes des mycelia aériens et de substrat ce qui peut nous renseigner sur la diversité probable des espèces au sein du même genre (Tableau 10).

Tableau 10. Caractéristique et croissance des 16 isolats sur différents milieux.

Isolat	Milieu	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigment soluble
<i>Streptomyces</i>					
A3'	Bennett	+++	-	Brun jaunâtre modéré	-
	GN	-	-	-	-
	ISP1	±	-	Brun jaunâtre foncé	-
	ISP2	+++	Blanc	Brun jaunâtre forte	± brun claire
A4	Bennett	+++	Brun jaunâtre grisâtre claire	Jaune orange modéré	-
	GN	++	-	jaune grisâtre	-
	ISP1	+++	Blanc	Brun jaunâtre claire	-
	ISP2	+++	Rouge foncé	Jaune orange foncé	± brun claire
A4'	Bennett	+++	Gris violacé foncé	Brun modéré	-
	GN	+	-	Brun jaunâtre grisâtre claire	-
	ISP1	+	-	Brun jaunâtre grisâtre claire	+ brun claire
	ISP2	+++	Blanc	Jaune orange foncé	± brun claire
A8	Bennett	+++	Gris claire	Jaune grisâtre	-
	GN	++	± blanc	Jaune pâle	-
	ISP1	++	± blanc	Jaune claire	-
	ISP2	+++	Brun jaunâtre grisâtre	Brun jaunâtre modéré et jaune orange foncé	-
A12	Bennett	++	Blanc	Jaune pâle	-
	GN	+++	Blanc	Jaune pâle	-
	ISP1	+++	Gris claire	Jaune grisâtre	-
	ISP2	+++	Gris noirâtre	Jaune orange foncé	-
C8	Bennett	+++	blanc (et parfois Brun jaunâtre grisâtre foncé)	Jaune orange foncé	-
	GN	+	Blanc	Jaune pâle	-
	ISP1	+	Blanc	Jaune pâle	-
	ISP2	+++	Blanc	Jaune orange foncé	-
D1	Bennett	+++	Brun rougeâtre grisâtre foncé	Jaune orangé modéré	-
	GN	++	blanc	Jaune pâle	-
	ISP1	+	blanc	Jaune claire	-
	ISP2	+++	Brun rougeâtre grisâtre foncé	Jaune orangé foncé	-
G3	Bennett	+++	Gris claire	Jaune grisâtre	-
	GN	+	-	Jaune pâle	-
	ISP1	++	± blanc	Jaune claire	-
	ISP2	+++	Gris claire	Brun olive modéré	-

Suite du Tableau 10

Isolat	Milieu	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigment soluble
H4	Bennett	+++	Gris foncé	Jaune pâle	-
	GN	+	-	Jaune pâle	-
	ISP1	++	-	Jaune claire	-
	ISP2	+++	Gris foncé	Jaune orangé foncé	-
<i>Streptosporangium</i>					
A1	Bennett	+++	Gris rosâtre	Brun modéré	-
	GN	++	± blanc	Jaune orange pâle	-
	ISP1	++	blanc	Jaune orange foncé	-
	ISP2	+++	Rose jaunâtre pâle	Brun modéré	-
A9	Bennett	+	± blanc	Brun jaunâtre claire	-
	GN	+	± blanc	Jaune orange foncé	-
	ISP1	++	-	Jaune orange modéré	-
	ISP2	++	blanc et -	Jaune orange foncé	-
H3	Bennett	++ à +++	± blanc	Brun jaunâtre forte et brun jaunâtre claire	-
	GN	+	± blanc	Brun jaunâtre forte	-
	ISP1	++	± blanc	Jaune orange foncé	-
	ISP2	++	blanc	Brun jaunâtre claire et Brun jaunâtre modéré	-
<i>Microbispora</i>					
B4	Bennett	±	-	Brun jaunâtre claire	-
	GN	+	-	Brun jaunâtre modéré	-
	ISP1	±	-	Brun jaunâtre modéré	-
	ISP2	++	± gris moyen	Brun jaunâtre forte	-
<i>Nocardia</i>					
E2	Bennett	++	Rose jaunâtre pâle	Orange forte	-
	GN	±	-	Jaune pâle	-
	ISP1	±	Blanc jaunâtre	Jaune pâle	-
	ISP2	+++	Rose jaunâtre pâle	Orange forte	-
Non identifiés					
D8	Bennett	+++	Rose jaunâtre pâle	Jaune orangé modéré	-
	GN	+	± Jaune orangé pâle	Jaune pâle	-
	ISP1	+	± blanc	Jaune orangé modéré	-
	ISP2	++	Jaune orange pâle	Jaune orangé profond	-
<i>Nocardiopsis</i>					
F3	Bennett	+++	Jaune grisâtre	Brun olive modéré	-
	GN	+++	blanc	Jaune pâle	-
	ISP1	+++	blanc	Jaune modéré	-
	ISP2	+++	Jaune grisâtre	Jaune modéré et Brun olive modéré	-

Pour la croissance ; - : absente ; ± : très faible ; + : faible ; ++ : moyenne ; +++ : bonne à très bonne

Pour les mycéliums et le pigment soluble ; - : absent ; ± : plus ou moins présent ; + : présent

2.2. Caractères physiologiques

Pour mieux regrouper les isolats, leur physiologie a été étudiée. Les résultats obtenus après sont mentionnés dans les tableaux 11 et 12.

Toutes les souches de *Streptomyces* utilisent le fructose, le mannitol, le mélibiose et le tréhalose et la majorité des autres sucres à l'exception de la souche C8 qui catabolise 7 sucres uniquement. La guanine n'est pas dégradée par aucune des souches étudiées et la xanthine est dégradée par la souche G3 uniquement.

Les souches de *Stretosporangium* n'utilisent pas la majorité des sucres (15) mais elles utilisent le cellobiose, le glucose et le tréhalose. La différence entre les trois souches est que A1 utilise le maltose, A9 dégrade l'amidon et n'utilise pas le galactose et H4 dégrade la tyrosine.

La souche identifiée comme *Microbispora* (B4) utilise 11 sucres sur 20 testés et dégrade uniquement la caséine, l'esculine et la gélatine.

La souche E2 rattachée au genre *Nocardia* catabolise uniquement le glucose, l'hypoxanthine et la gélatine.

La souche F3 de *Nocardiosis* utilise tous les sucres et tous les autres composés testés sauf la guanine et l'arbutine.

La souche D8 catabolise tous les sucres à l'exception du lactose et tous les autres composés testés sauf l'esculine et la gélatine.

La comparaison des souches du même genre a été réalisée par le calcul de l'indice de Sokal et Michener (SM) afin de déterminer les souches qui pourrait appartenir à la même espèce et le nombre probable d'espèces par genre. Un exemple de calcul est donné pour la comparaison entre A3' et A4 :

$$SM = (SM_{++} + SM_{-}) / (SM_{++} + SM_{-} + D)$$

$$SM = (15 + 6) / (15 + 6 + 10)$$

$$SM = 21 / 31$$

$$SM = 67,7 \%$$

Tableau 11. Caractéristiques physiologiques des isolats de *Streptomyces*.

Test	Souche										Test	Souche									
	A3'	A4	A4'	A8	A12	C8	D1	G3	H4			A3'	A4	A4'	A8	A12	C8	D1	G3	H4	
Dégradation de :											Utilisation de										
Adénine	-	+	+	+	-	+	+	+	+		D (+) lactose	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
Guanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-		D-mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
Hypoxanthine	-	+	+	+	+	-	-	+	-		D (+) mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Tyrosine	-	-	-	+	+	+	+	+	-		D (+) melezitose monohydrate	-	-	+	+	+	+	+	+	-	
Xanthine	-	-	-	-	-	-	-	+	-		α -D (+) melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Amidon	-	-	-	+	-	+	+	+	-		D (+) raffinose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
Arbutine	-	+	-	-	+	+	+	-	-		D (+) ribose	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
Caséine	-	+	-	+	-	+	-	+	+		D (-) salicin	+	+	+	-	+	-	+	-	-	
Esculine	-	+	-	-	+	+	+	-	-		D-sorbitol	+	-	-	+	+	-	+	+	-	
Gélatine	-	+	-	+	+	+	-	+	+		D (+) tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Tween 80	-	+	+	+	+	+	+	+	+		D-xylose RPPA	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
Utilisation de :											L (+) arabinose										
D (+) cellobiose	+	+	+	+	+	-	+	+	+		α -L (+) rhamnose monohydrate	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
D (-) fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+		maltose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
D (+) galactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+		meso-Erythritol	-	-	-	-	+	+	-	+	-	
D (+) glucose	+	+	+	+	+	-	+	+	+		meso-inositol	+	-	+	+	+	-	+	+	-	

Tableau 12.Caractéristiques physiologiques des isolats non *Streptomyces*.

Test	Souche							Test	Souche						
	A1	A9	H3	B4	E2	D8	F3		A1	A9	H3	B4	E2	D8	F3
Dégradation de :								Utilisation de							
Adénine	-	-	-	-	-	-	+	D (+) lactose	-	-	-	+	-	-	+
Guanine	-	-	-	-	-	-	-	D-mannitol	-	-	-	+	-	+	+
Hypoxanthine	-	-	-	-	+	+	+	D (+) mannose	-	-	-	-	-	+	+
Tyrosine	-	-	+	-	-	+	+	D (+) melezitose monohydrate	-	-	-	-	-	+	+
Xanthine	-	-	-	-	-	+	+	α -D (+) melibiose	-	-	-	-	-	+	+
Amidon	-	+	-	-	-	-	+	D (+) raffinose	-	-	-	+	-	+	+
Arbutine	-	-	-	-	-	-	-	D (+) ribose	-	-	-	+	-	+	+
Caséine	+	+	+	+	-	-	+	D (-) salicin	-	-	-	+	-	+	+
Esculine	-	-	-	+	-	+	+	D-sorbitol	-	-	-	-	-	+	+
Gélatine	+	+	+	+	+	+	+	D (+) tréhalose	+	+	+	-	-	+	+
Tween 80	+	+	+	-	-	-	+	D-xylose RPPA	-	-	-	-	-	+	+
Utilisation de								L (+) arabinose							
D (+) cellobiose	+	+	+	+	-	+	+	α -L (+) rhamnose monohydrate	-	-	-	+	-	+	+
D (-) fructose	-	-	-	+	-	+	+	maltose	+	-	-	-	-	+	+
D (+) galactose	+	-	+	+	-	+	+	meso-Erythritol	-	-	-	-	-	+	+
D (+) glucose	+	+	+	+	+	+	+	meso-inositol	-	-	-	-	-	+	+

Concernant le genre *Streptomyces* à l'exception des souches A8 et G3 qui ont montré un SM de 93,5% toutes les autres souches partagent un SM inférieur à 85%. Donc, les souches A8 et G3 pourraient appartenir à la même espèce et les autres souches appartiennent chacune à une espèce à part (Tableau 13).

Tableau 13. Valeurs de l'indice de Sokal et Michener pour les souches de *Streptomyces*.

Souche	A3'	A4	A4'	A8	A12	C8	D1	G3	H4
A3'	100								
A4	67,7	100							
A4'	83,9	77,4	100						
A8	70,9	70,9	80,6	100					
A12	80,6	74,2	77,4	77,4	100				
C8	22,6	45,2	35,5	48,4	45,2	100			
D1	74,2	67,7	77,4	77,4	80,6	51,6	100		
G3	64,5	64,5	74,2	93,5	77,4	48,4	70,9	100	
H4	67,7	70,9	67,7	67,7	51,6	61,3	51,6	61,3	100

Les trois souches de *Streptosporangium* partagent des pourcentages de similarité de 90,3 à 93,5% qui sont supérieurs au seuil de séparation entre les espèces (85%). Cela suggère l'appartenance des trois souches à la même espèce (Tableau 14).

Tableau 14. Valeurs de l'indice de SokaletMichener pour les souches de *Streptosporangium*.

Souche	A1	A9	H3
A1	100		
A9	90,3	100	
H3	93,5	90,3	100

2.3. Étude moléculaire

Le séquençage de l'ADNr 16S a été réalisé pour 15 souches. Les séquences de deux souches (C8, appartenant au genre *Streptomyces* et F3, identifiée comme *Nocardiopsis*) sont inexploitable (moins de 100 bases). Les séquences d'ADNr 16S obtenues ont été alignées et comparées avec les séquences des espèces-types des bactéries contenues dans la base de données génomique «Eztaxon-e». Cette étude a permis de confirmer le genre et de déterminer les espèces les plus proches de nos souches.

Sur la base des études phylogénétiques 8 souches identifiées morphologiquement comme *Streptomyces* sont assignées à ce genre. Les souches A8 et G3 sont proches de *S. lydicus* avec les pourcentages de similarité de 99,36 et 99,65 % respectivement et forment un cluster à part avec cette espèce et l'espèce *Streptomyces chattanoogensis*. Les autres souches sont rattachées à des espèces différentes avec des % de similarité de 98,37 à 99,93% et forment 6 clusters distincts sur l'arbre phylogénétique (Tableau 15 et Figure 17). Au total, nous avons 7 espèces distinctes parmi nos souches de *Streptomyces*.

Les études phylogénétiques, ont confirmé l'appartenance des souches A1, A9 et H3 au genre *Streptosporangium*. Ces études ont permis de rattachées les souches A1 et H3 à l'espèce *Sg. album* avec les pourcentages de similarité de 98,56 et 98,58 % respectivement et la souche A9 à l'espèce *Sg. Carneum* avec un pourcentage de similarité de 98,60 % (Tableau 16). Sur l'arbre phylogénétique les trois souches sont séparées en trois lignées distinctes (Figure 18). Il faut noter que le test blast entre les séquences des souches A1 et H3 a donné un pourcentage de similarité de 98,48%.

L'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche B4 a confirmé son affiliation au genre *Microbispora*. Cette souche est proche *M. bryophytorum* avec un taux de similarité de 100 % (Tableau 17 et Figure 19).

La souche E2 identifiée morphologiquement comme *Nocardia* appartient effectivement à ce genre sur la base des études phylogénétiques. Cette souche partage un % de similarité de 99,93% avec *N. nova* (Tableau 18 et Figure 20).

Tableau 15. Résultats du blast des séquences des souches du genre *Streptomyces* avec les espèces les plus de ce genre.

Espèce	Souche-type N° d'accèsion	N° de la séquence	Isolat et pourcentage de similarité							
			A3'	A4	A4'	A8	A12	D1	G3	H4
<i>S. glomeratus</i>	LMG 19903 ^T	AJ781754	99,29*	95,89	96,24	96,24	95,44	96,18	96,6	94,29
<i>S. chromofuscus</i>	NBRC 12851 ^T	AB184194	98,73	96,03	96,39	95,67	96,08	96,03	96,02	94,58
<i>S. flavoviridis</i>	NBRC 12772 ^T	AB184842	98,73	96,67	96,1	96,16	96,08	96,53	96,45	94,44
<i>S. lanatus</i>	NBRC 12787 ^T	AB184845	96,89	98,37*	98,09	96,38	95,37	96,32	96,67	94,79
<i>S. neopeptinius</i>	KNF 2047 ^T	EU258679	96,35	98,35	97,64	96,85	95,62	97,5	96,92	95,04
<i>S. panaciradicis</i>	1MR-8 ^T	KF971876	97,17	98,16	97,38	95,74	94,94	96,1	96,03	94,22
<i>S. psammoticus</i>	NBRC 13971 ^T	AB184554	96,32	97,8	98,8*	96,67	95,37	96,89	96,95	95,22
<i>S. durhamensis</i>	NRRL B-3309 ^T	JNXR01000068	96,53	97,59	98,44	95,74	94,73	95,96	96,03	94,72
<i>S. filipinensis</i>	NBRC 12860 ^T	AB184198	96,68	97,59	98,37	95,74	94,8	95,89	96,03	94,65
<i>S. lydicus</i>	NBRC 13058 ^T	AB184281	96,32	95,74	96,46	99,36*	96,94	98,16	99,65*	95,08
<i>S. chattanoogensis</i>	DSM 40002 ^T	AJ621611	96,25	95,67	96,39	99,22	96,73	98,02	99,5	94,86
<i>S. rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i>	DSM 41429 ^T	AJ621610	96,46	95,75	96,6	98,94	97,08	97,88	99,22	95,15
<i>S. samsunensis</i>	M1463 ^T	EU077190	95,79	94,94	95,01	96,79	99,5*	96,16	97,14	95,00
<i>S. malaysiensis</i>	NBRC 16446 ^T	AB249918	96,51	94,65	94,58	96,29	99,00	96,16	96,65	95,14
<i>S. indonesiensis</i>	DSM 41759 ^T	DQ334783	95,6	95,74	95,88	97,8	98,93	97,24	97,94	95,35
<i>S. glebosus</i>	CGMCC 4.1873 ^T	HQ244456	96,64	97,15	97,01	98,69	97,01	99,93*	98,69	95,81
<i>S. hygrosopicus</i> subsp. <i>glebosus</i>	NBRC 13786 ^T	AB184479	96,39	96,46	96,46	98,3	96,44	99,36	98,58	95,44
<i>S. libanis</i> subsp. <i>Rufus</i>	LMG 20087 ^T	AJ781351	96,39	96,46	96,46	98,3	96,44	99,36	98,58	95,44
<i>S. chrestomyceticus</i>	DSM 40545 ^T	AJ621609	96,46	95,75	96,6	98,94	97,08	97,88	99,22	95,15
<i>S. aureofaciens</i>	NBRC 12843 ^T	AB184189	94,24	94,01	94,66	94,64	94,63	95,01	95,00	99,22*
<i>S. avellaneus</i>	NBRC 13451 ^T	AB184413	94,24	94,01	94,66	94,64	94,63	95,01	95,00	99,22*
<i>Streptomyces xanthocidicus</i>	NBRC 13469 ^T	AB184427	94,39	94,88	95,45	95,36	94,85	95,73	95,72	98,78

*: le pourcentage le plus élevé; ^T: souche-type.

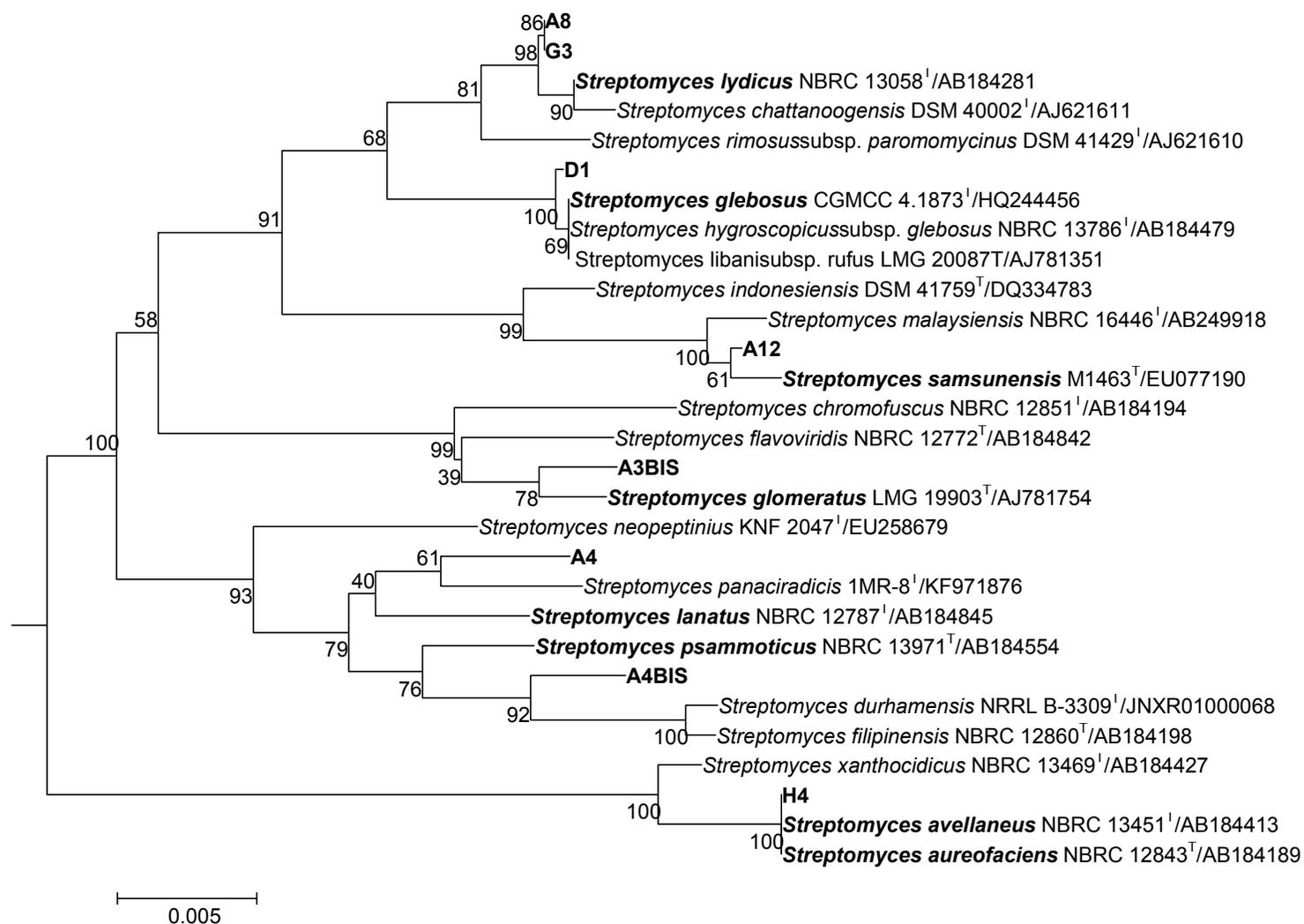


Figure 17. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les isolats de *Streptomyces* et les souches-types de quelques espèces de ce genre.

Les nombres aux nœuds sont les pourcentages du « bootstrap » et la barre indique 0,005 substitutions par position de nucléotide.

Tableau 16. Résultats du blast des séquences des souches du genre *Streptosporangium* avec les espèces les plus de ce genre.

Espèce	Souche-type N° d'accension	N° de la séquence	Pourcentage de similarité		
			A1	A9	H3
<i>Sg. album</i>	DSM 43023 ^T	X89934	98,56*	98,46	98,58*
<i>Sg. carneum</i>	DSM 44125 ^T	X89938	98,41	98,6*	97,87
<i>Sg. Vulgare</i>	DSM 43802 ^T	X89955	98,34	98,31	98,44
<i>Sg. roseum</i>	DSM 43021 ^T	CP001814	98,34	98,31	98,44
<i>Sg. canum</i>	HBUM 170018 ^T	AY996844	98,27	97,94	98,37
<i>Sg. terrae</i>	VRC21 ^T	JX082289	98,27	98,45	98,16
<i>Sg. Methystogenes subsp. amethystogenes</i>	NRRL B-2639 ^T	JOEQ01000084	98,12	98,38	97,66
<i>Sg. amethystogenes subsp. fukuiense</i>	JCM 10083 ^T	AB537172	98,05	98,31	97,59
<i>Sg. longisporum</i>	DSM 43180 ^T	X89944	98,05	98,31	97,73
<i>Sg. sonchi</i>	NEAU-QS7 ^T	KF928747	97,69	97,64	97,94
<i>Sg. nanhuense</i>	NEAU-NH11 ^T	KF146932	97,62	97,5	97,8
<i>Sg. fragile</i>	DSM 43847 ^T	X89942	97,55	97,72	97,17
<i>Sg. kronopolitis</i>	NEAU-ML10 ^T	KF956805	97,55	97,5	97,8
<i>Sg. oxazolinicum</i>	K07-0460 ^T	AB594818	97,5	97,57	97,68
<i>Sg. jomthongense</i>	30EHS ^T	JQ922513	97,41	97,41	97,73
<i>Sg. shengliensis</i>	NEAU-GH7 ^T	KC513503	97,4	97,35	97,52
<i>Sg. subfuscum</i>	NEAU-TWSJ13 ^T	KF913196	97,4	97,49	97,23
<i>Sg. pseudovulgare</i>	DSM 43181 ^T	X89946	97,33	97,5	96,88
<i>Sg. Purpuratum</i>	CY-15110 ^T	AF191735	97,25	97,2	97,71
<i>Sg. sandarakinum</i>	GW-12028 ^T	JX977118	97,2	97,48	97,5
<i>Sg. Subroseum</i>	CY-7113 ^T	AF191734	97,18	97,5	97,21
<i>Sg. Anatoliense</i>	N9999 ^T	HQ157194	96,97	96,84	97,16
<i>Sg. nondiastaticum</i>	IFO 13990 ^T	U48994	96,95	97,42	97,27
<i>Sg. violaceochromogenes</i>	DSM 43849 ^T	X89951	96,47	96,77	96,39
<i>Sg. Yunnanense</i>	CY-11007 ^T	AF191733	96,16	95,88	96,49

*: le pourcentage le plus élevé; ^T: souche-type.

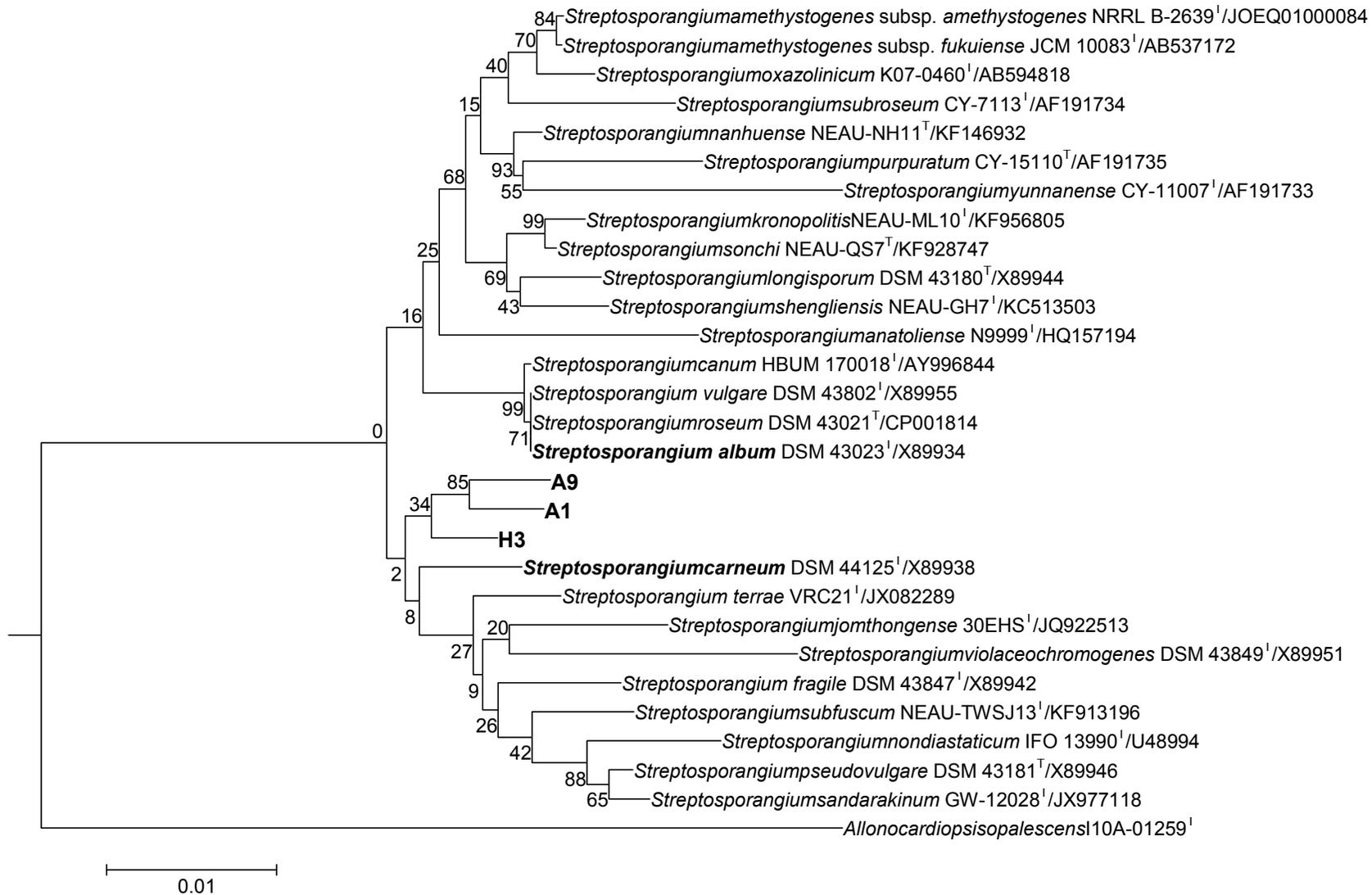


Figure 18. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre les souches de *Streptosporangium* et les souches-types de toutes les espèces de ce genre.

Tableau 17. Résultats du blast de la séquence de la souche B4 avec les espèces les plus du genre *Microbispora*.

Espèce	Souche-type N° d'accèsion	N° de la séquence	Pourcentage de similarité
<i>M. bryophytorum</i>	NEAU-TX2-2 ^T	KF886293	100*
<i>M. amethystogenes</i>	JCM 3021 ^T	U48988	99,07
<i>M. roseasubsp. rosea</i>	IFO 14044 ^T	D86936	98,56
<i>M. corallina</i>	DF-32 ^T	AB018046	98,27
<i>M. roseasubsp. aerata</i>	ATCC 15448 ^T	U48984	98,2
<i>M. hainanensis</i>	211020 ^T	FJ261972	98,06
<i>M. thailandensis</i>	NN276 ^T	HM043728	97,92
<i>M. siamensis</i>	DMKUA-245 ^T	FJ199993	97,49
<i>M. mesophila</i>	JCM 3151 ^T	AF002266	97,13

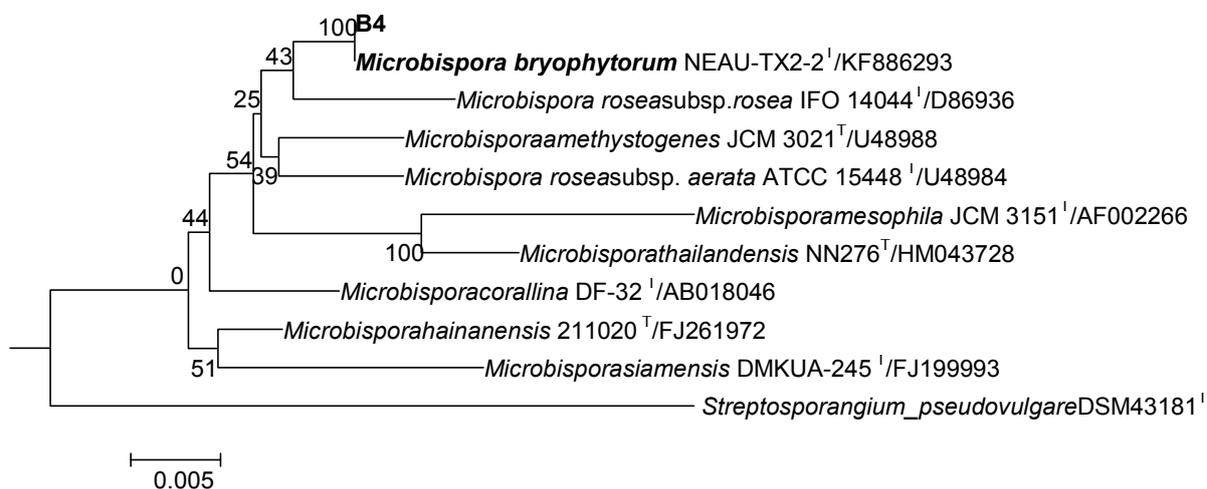


Figure 19. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre la souche de *Microbispora* et les souches-types de toutes les espèces de ce genre.

Tableau 18. Résultats du blast de la séquence de la souche E2 avec les espèces les plus du genre *Nocardia*.

Espèce	Souche-type N° d'accension	N° de la séquence	Pourcentage de similarité
<i>N. nova</i>	JCM 6044 ^T	Z36930	99,93*
<i>N. jiangxiensis</i>	NBRC 101359 ^T	BAGB01000020	98,7
<i>N. aobensis</i>	IFM 0372 ^T	AB126876	98,41
<i>N. otitidiscaviarum</i>	NBRC 14405 ^T	BAGD01000059	98,34
<i>N. mikamii</i>	W8061 ^T	EU484388	98,27
<i>N. africana</i>	SD769 ^T	AF277198	98,26
<i>N. niigatensis</i>	NBRC 100131 ^T	BAGC01000015	98,19
<i>N. vermiculata</i>	IFM 0391 ^T	AB126873	98,16
<i>N. vaccinii</i>	DSM 43285 ^T	Z36927	98,12
<i>N. veterana</i>	NBRC 100344 ^T	BAGM01000031	98,05
<i>N. miyunensis</i>	117 ^T	AY639901	98,05
<i>N. elegans</i>	IMMIB N-402 ^T	AJ854057	98,05
<i>N. kruczakiae</i>	ATCC BAA-948 ^T	AY441974	98,05
<i>N. acidivorans</i>	GW4-1778 ^T	AM402972	97,98
<i>N. vinacea</i>	NBRC 16497 ^T	BAGN01000059	97,91
<i>N. cyriacigeorgica</i>	NBRC 100375 ^T	BAFY01000107	97,91

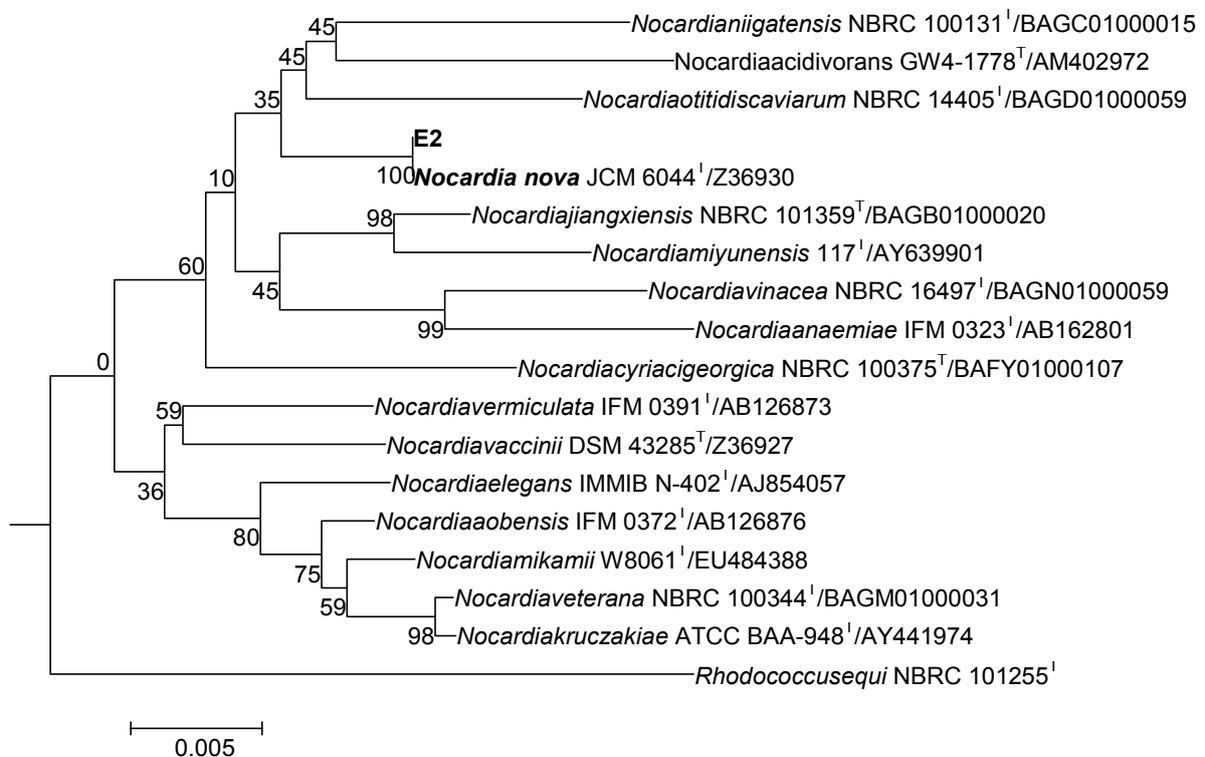


Figure 20. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant les relations entre la souche de *Nocardia* et les souches-types de quelques espèces de ce genre.

3. Discussion

Neuf souches d'actinobactéries étudiées ont un mycélium aérien portant des chaînes de spores de formes différentes. Elles sont de forme spirale pour les souches A4, A12, G3 et H4, en boucles pour les souches A8, C8 et D1 et droites à flexueuses pour les souches A3' et A4'. Ces morphologies sont des caractères typiques de *Streptomyces* (Pridham *et al.*, 1958).

Un indice de Sokal et Michener de 93,5% entre les souches A8 et G3 a été obtenu. Ce taux est supérieur à 85 %, limite de séparation entre les espèces proposé par Sokal et Michener (1958), ce qui met en place la possibilité de leur appartenance à une même espèce. Toutes les autres souches partagent un SM inférieur à 85% et donc chacune appartient à une espèce à part. L'étude moléculaire réalisée pour 8 souches a confirmé l'appartenance de toutes les souches étudiées au genre *Streptomyces*, la parenté entre les souches A8 et G3 qui sont rapprochées à la même espèce et l'affiliation des 5 autres souches à 5 espèces distinctes. Alors, il y a une concordance entre les résultats de l'étude morphologique, l'étude physiologique et l'étude moléculaire. Cette constatation a été faite par Meklat *et al.* (2012). Les souches A8 et G3 sont rapprochées à l'espèce *S. lydicus* (Deboeret *et al.*, 1956) avec les pourcentages de similarité de 99,36 % et 99,65 % respectivement qui sont supérieurs à 98,65 %, limite de séparation entre les espèces (Kim *et al.*, 2014). Ces deux souches partagent un pourcentage de similarité de leur ARNr 16S de 99,72 mais elles peuvent appartenir à deux espèces différentes parce que la souche A8 appartient au type L et la souche G3 appartient au type S de *Streptomyces*, et que G3 catabolise la xanthine et le méso-érythritol alors que A8 ne les catabolise pas.

La souche A3' forme un mycélium de chaînes de spores droites à flexueuses, ce qui nous amène à penser au type SC ou RF de *Streptomyces*. Ceci est affirmé par l'analyse moléculaire qui rapproche cette souche à *S. glomeratus* (Gause et Preobrazhenskaya, 1986) avec un pourcentage de similarité de 99,29 % qui est supérieur à 98,65 %. *S. glomeratus* forme des chaînes de spores de type RA ou S (Bergey, 2012) qui est différente de la morphologie de la souche A3'. Il faut cependant signaler que *S. glomeratus* a fait l'objet de très peu de tests physiologiques, ce qui rend la comparaison difficile. D'après le Manuel de Bergey (2012), l'espèce la plus proche à *S. glomeratus* est *S. bangladeshensis* (Al-Bari *et al.*, 2005) avec une similarité de 99,20%, ce pourcentage n'est pas loin de celui que nous avons obtenu (99,29%), cela nous laisse suggérer que la souche A3' pourrait constituer une nouvelle espèce sous réserve d'hybridation ADN-ADN.

La souche A4 forme un mycélium de chaînes de spores en spires caractéristique du type S de *Streptomyces*. L'analyse moléculaire atteste ce classement en rapprochant cette souche à *S. lanatus* (Frommer, 1959) avec un pourcentage de similarité inférieur à 98,65 % (98,37 %), ce qui

confirme l'appartenance de la souche A4 à une nouvelle espèce. La comparaison de la physiologie de la souche A4 et de l'espèce *S. lanatus* (peu de tests sont disponibles) montre que A4 ne dégrade pas le raffinose et *S. lanatus* est capable de le dégrader (Frommer, 1959).

Les caractères morphologiques de la souche A4' nous a permis de la rattacher au genre *Streptomyces*. Les analyses phylogénétiques basées sur le séquençage de l'ADNr 16S ont permis de confirmer cette hypothèse et de rapprocher la souche A4' de l'espèce *S. psammoticus* (Virgilio et Hengeller, 1960), avec un taux de similarité de 98,80 % qui est légèrement supérieure à 98,65, la limite de séparation entre les espèces. La comparaison des résultats physiologiques entre la souche A4' et *S. psammoticus* montre que A4' est différente de *S. psammoticus* parce qu'elle utilise plusieurs sucres qui ne sont pas utilisés par *S. psammoticus* (Bergey, 2012) (Tableau 19). En plus, il y a plusieurs espèces décrites qui sont plus proches de *S. psammoticus* avec des pourcentages de similarité plus élevés que celui de la souche A4' comme *S. avellaneus* (100%) (Baldacci et Grein, 1966), *S. aureofaciens* (99,60%) (Duggar, 1948) et *S. chrysomallus* subsp. *Fumigatus* (99,3%) (Frommer, 1959). Cela suggère que la souche A4' pourrait être une espèce nouvelle.

Tableau 19. Comparaison des caractères physiologiques l'isolat A4' avec *S. psammoticus*, l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Virgilio et Hengeller, 1960).

Utilisation de:	Souche	
	A4'	<i>S. psammoticus</i>
D-mannitol	+	-
D-raffinose	+	-
D-xylose	+	-
L-arabinose	+	-
L-rhamnose	+	-
Inositol	+	-
Salicin	+	-

La souche A12 forme des chaînes de spores en spirales, ce qui permet de la classer parmi les *Streptomyces* du type S. Par l'analyse moléculaire du gène codant pour l'ARNr 16S, le genre de cette souche est confirmé avec une similitude à *S. samsunensis* (Sazaket *al.*, 2011) supérieur à 98,65 % (99,50 %). Ce pourcentage est de même grandeur que ceux enregistrés parmi les espèces de *Streptomyces* ce qui n'élimine pas l'originalité de la souche A12 de tant plus que notre souche présente neuf différences physiologiques avec l'espèce *S. samsunensis* (Tableau 20).

Tableau 20. Comparaison des caractères physiologiques la souche A12 avec *S. samsunensis*, l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Sazaket *al.*, 2011).

Test	Souche	
	A12	<i>S. samsunensis</i>
Dégradation de:		
Hypoxanthine	+	-
Tyrosine	+	-
Caséine	-	+
Esculine	+	-
Gélatine	+	-
Utilisation de:		
D-raffinose	+	-
D-salicin	+	-
D-xylose	+	-
Inositol	+	-

L'étude moléculaire de la souche D1 l'a rapproché à *S. glebosus* (Rong et Huang, 2012) avec un pourcentage de similarité de 99,93 % qui est largement supérieur à 98,65 %. En effet, cette espèce était considéré comme sous espèce de l'espèce *S. hygroscopicus* dans le manuel de Bergey (2012), elle partage des % de similarités élevés avec : *S. caniferus*, AB184640, 100%; *S. libanisubsp. rufus*, AJ781351, 100%; *S. platensis*, AB045882, 99.9%; *S. libanisubsp. libani*, AB184414, 99.7%; *S. tubercidicus*, AJ621612, 99.6%; *S. nigrescens*, DQ442530, 99.6%; *S. hygroscopicussubsp. decoyicus*, AY999883, 99.6%; *S. catenulae*, AJ621613, 99.3%; *S. ramulosus*, DQ026662, 99.3%; *S. misakiensis*, AB217605, 99.3%; *S. sioyaensis*, DQ026654, 99.2%; *S. monomycini*, DQ445790, 99%. Les travaux de Rong et Huang (2012) basés sur « multilocus sequence analysis » (MLSA) et l'hybridation ADN-ADN ont permis de réviser la place taxonomiques de plusieurs sous espèces dont fait partie *S. hygroscopicussubsp. glebosus* qui a été reclassée comme une espèce à part. Vu les arguments présentés ci-dessous et le nombre important de différences physiologiques (Tableau 21) obtenues entre la souche D1 et *S. glebosus*, la souche D1 pourrait être une espèce à part.

Tableau 21. Comparaison des caractères morphologiques et physiologiques la souche D1 avec *S. glebosus*, l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Rong et Huang, 2012).

Caractère	Souche	
	D1	<i>S. glebosus</i>
Couleur du MA sur ISP2	Brun rougeâtre grisâtre foncé	Blanc à gris claire
Dégradation de:		
Guanine	-	+
Xanthine	-	+
Amidon	+	-
Arbutine	+	-
Caséine	-	+
Esculine	+	-
Tween 80	+	-
Utilisation de:		
L-arabinose	-	+
L-rhamnose	+	-

La souche H4a été rapprochée à deux espèces, *S. aureofaciens* (Duggar, 1948) et *S. avellaneus* (Baldacci et Grein, 1966) avec le même pourcentage de similarité de 99,22 % qui est supérieur à 98,65 %. Le pourcentage de similarité entre *S. aureofaciens* et *S. avellaneus* est 99,5 % (Bergey's Manual, 2012) qui est supérieur à 99,22%. Peu de différences physiologiques sont notés entre la souche H4 et les espèces les plus proches (Tableau 22). L'appartenance de la souche H4 à l'une des espèces les plus proches ou à une espèce à part pourrait être vérifié par d'autres études moléculaires comme l'hybridation ADN – ADN ou MLSA.

Tableau 22. Comparaison des caractères physiologiques la souche H4 avec *S. avellaneus* (Baldacci et Grein, 1966) et *S. aureofaciens* (Duggar, 1948), les espèces les plus proches phylogénétiquement.

Utilisation de:	Souche		
	H4	<i>S. avellaneus</i>	<i>S. aureofaciens</i>
D-raffinose	+	-	-
D-xylose	+	±	±
L-arabinose	+	-	+

La souche C8 présente des caractères morphologiques du genre *Streptomyces*. Les études physiologiques de cette souche montrent des indices de Sokal et Michener très bas (22,6 à 48,4 %) avec les autres souches de *Streptomyces* étudiées dans le présent travail. Ces taux sont très

inférieurs à la limite de séparation entre les espèces (85%). Cela implique que la souche C8 n'appartient à aucune des espèces de la présente étude.

Les souches A1, A9 et H3 ont été rattachées au genre *Streptosporangium* sur la base des études morphologiques et moléculaires. Les résultats de la physiologie montrent que le coefficient de SM entre les trois souches est supérieur à 85 % donc elles peuvent appartenir à la même espèce. Cependant, les études moléculaires de ces souches les a rapproché de deux espèces avec les pourcentages de similarité de 98,56 à 98,60%. La souche A9 partage une similarité de 98,60% avec *Sg. Carneum*(Mertz et Yao, 1990). Les souches A1 et H3 ont été rapproché à la même espèce *Sg. album* (Nonomura H et Ohara Y, 1960) ce qui nous a incité à faire l'alignement de leurs séquences de l'ADNr 16S qui a donné un pourcentage de similarité de 98,48%. Tous les % de similarité obtenues ci-dessus sont inférieurs à 98,65% ce qui nous laisse dire que nous avons trois nouvelles espèces de *Streptosporangium* (Kim *et al.*, 2014) de temps plus que certaines espèces de ce genre partagent un % de similarité de leur ADNr 16S de 100% comme est le cas pour *Streptosporangium roseum* (Couch, 1955) et *Streptosporangium vulgare* (Nonomura et Ohara, 1960). Cela est renforcé par les différences physiologiques entre nos souches et les espèces les plus proches (Tableau 23).

L'absence de la concordance entre l'étude physiologique qui a suggéré la présence d'une seule espèce et les études moléculaires qui confirment la présence de trois espèces distinctes est probablement due à choix des tests physiologiques qui ne sont pas discriminants dans le cas des espèces de *Strapto**sporangium* contrairement aux espèces de *Streptomyces* étudiées dans le présent travail. Des résultats similaires ont été trouvés entre *Saccharothrix longispora* et *Sa. Syringae*(Zitouni, 1995). Ces deux espèces sont distinctes sur la base des études moléculaires (Labeda et Kroppenstedt, 2000), mais elles sont proches sur la base de la taxonomie numérique (SM = 85,7%) (Zitouni, 1995).

Tableau 23. Comparaison des caractères physiologiques des souches A1 et H3 avec *Sg. album* et A9 avec *Sg. carneum*, les espèces les plus proches phylogénétiquement (Nonomura H et Ohara Y, 1960; Mertz et Yao, 1990).

Tests	Souches			Tests	Souches	
	A1	H3	<i>Sg. album</i>		A9	<i>Sg. carneum</i>
Dégradation de:				Dégradation de:		
Tyrosine	-	+	+	Tyrosine	-	+
Arbutine	-	-	+	Amidon	+	-
Esculine	-	-	+	Gélatine	+	-
Utilisation de:				Utilisation de:		
D-fructose	-	-	+	D-fructose	-	+
D-mannitol	-	-	+	D-galactose	-	+
D-mannose	-	-	+	D-lactose	-	+
D-raffinose	-	-	+	D-mannose	-	+
D-sorbitol	-	-	+			
D-xylose	-	-	+			
L-arabinose	-	-	+			
maltose	+	-	+			

La souche B4 produit des spores en paires longitudinales portés sur les sporophores d'hyphes courts du mycélium aérien. Ces caractères morphologiques sont typiques au genre *Microbispora*, ce qui nous a permis de confirmer le genre de cette souche et d'éliminer la possibilité de leur appartenance aux espèces *M. Mesophila* JCM 3151^T et *M. thailandensis* NN276^T qui produisent des spores sphériques uniques sur les sporophores courtes (Duangmalet *al.*, 2012). L'étude moléculaire a soutenu cette déduction et en plus, a montré que la souche B4 est plus proche de l'espèce *M. bryophytorum* NEAU-TX2-2^T (Liet *al.*, 2015) avec un pourcentage de similarité de 100 %. La souche B4 pourrait être distinguée de *M. bryophytorum* par quelques caractères morphologiques et physiologiques (Li *et al.*, 2015) (Tableau 24).

Tableau 24. Comparaison des caractères physiologiques l'isolat B4 avec *M. bryophytorum*, l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Li *et al.*, 2015).

Caractère	Souches	
	B4	<i>M. bryophytorum</i>
Dégradation de:		
Tyrosine	-	+
Amidon	-	+
Utilisation de:		
D-mannose	-	+
D-raffinose	+	-
L-rhamnose	+	-
maltose	-	+

La souche E2 montre une forme de mycélium ramifié en courtes chaînes de spores en zigzag ce qui correspond au genre *Nocardia*. Les espèces du genre *Nocardia* sont des actinobactéries environnementaux ubiquitaires qui peuvent être isolées à partir du sol (Khan *et al.*, 1997; Kachueiet *al.*, 2012), de l'eau, des végétaux en décomposition et d'autres matières organiques (Vetluginaet *al.*, 1990; Khan *et al.*, 1997). Elles sont habituellement des pathogènes opportunistes causales de la maladie, nocardiose, surtout chez les patients immunodéprimés (Beanmanet *al.*, 1973).

L'étude moléculaire a confirmé l'hypothèse développée lors des études morphologiques que la souche E2 appartient au genre *Nocardia*. La souche E2 a été rapprochée à l'espèce *N. nova* (Tsukamura, 1983) avec un pourcentage de similarité hautement supérieur à 98,65 % (99,93 %). *N. nova* a été isolée pour la première fois à partir des crachats des patients aux infections pulmonaires due aux souches de cette espèce (Tsukamura, 1983). Cette espèce a montré certaines différences physiologique avec notre souche consignées dans le tableau 25 ci-dessous (Barbara *et al.*, 2006; Kiskaet *al.*, 2002).

Tableau 25. Comparaison des caractères physiologiques la souche E2 avec *N. nova* l'espèce la plus proche phylogénétiquement (Tsukamura, 1983).

Test	Souches	
	E2	<i>N. nova</i>
Dégradation de:		
Hypoxanthine	+	-
Arbutine	-	+
Gélatine	+	-
Utilisation de:		
D-galactose	-	+
D-sorbitol	-	+

La souche F3 a montrée des caractères morphologiques qui ne permettent pas de statuer sur son appartenance aux genres *Nocardiopsis* (Meyer, 1976) ou *Saccharothrix* (Labeda et al., 1984). L'étude des caractères chimiques de la souche F3 pourrait clarifier sa position taxonomique au niveau générique (Meyer, 1976; Kroppenstedt et Evtushenko, 2006).

II. ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTE

1. Évaluation du potentiel antagoniste des 16 souches d'actinobactéries sur le milieu ISP2

Les 16 souches d'actinobactéries ont été testées contre huit germes cibles; deux bactéries à Gram positif, deux bactéries à Gram négatif, trois champignons filamenteux et une levure par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu ISP2 et ce, pour évaluer leur potentialité de production des antibiotiques. Parmi les 16 souches d'actinobactéries, 12 (75 %) se sont montrées actives contre au moins un germe-cible. En revanche, 25 % n'ont présenté aucune activité. Environ 75,0 % (9 souches) des souches actives présentent une activité à la fois antibactérienne et antifongique, 16,7 % (2 souches) une activité antifongique uniquement et 8,3 % (1 souche) une activité antibactérienne uniquement. Aucune souche d'actinobactéries n'a montré une activité contre les bactéries à Gram négatif testées. L'activité antimicrobienne est obtenue chez toutes les souches (100 %) de *Streptomyces*, une souche (33,3 %) de *Streptosporangium*, et la souche (100%) de *Nocardiopsis/Saccharothrix* mais elle est absente chez les souches de *Microbispora* et *Nocardia*.

L'activité antifongique, obtenue chez 11 souches sur 16 souches testées (68,75 %), est généralement moyenne pour les souches de *Streptomyces* et faible pour les autres souches non *Streptomyces*. L'activité antifongique maximale obtenue est forte, elle est de 32 mm (sans prise en compte du diamètre du cylindre d'agar) par la souche A12 contre *F. culmorum*. Les activités maximales obtenues contre les autres champignons sont de 22 et 21 mm par la souche H4 contre *A. carbonarius* et *U. ramanniana* respectivement et 13 mm obtenue par la souche A12 contre *C. albicans*. Les souches A8, A12 et H4 sont actives contre les quatre champignons testés. L'activité antifongique des souches d'actinobactéries étudiées est obtenue contre surtout *U. ramanniana* (62,5 % de souches), puis contre *F. culmorum* et *A. carbonarius* (37,5 % de souches) vient en dernier la levure *C. albicans* (18,75 % de souches) (Figure 21).

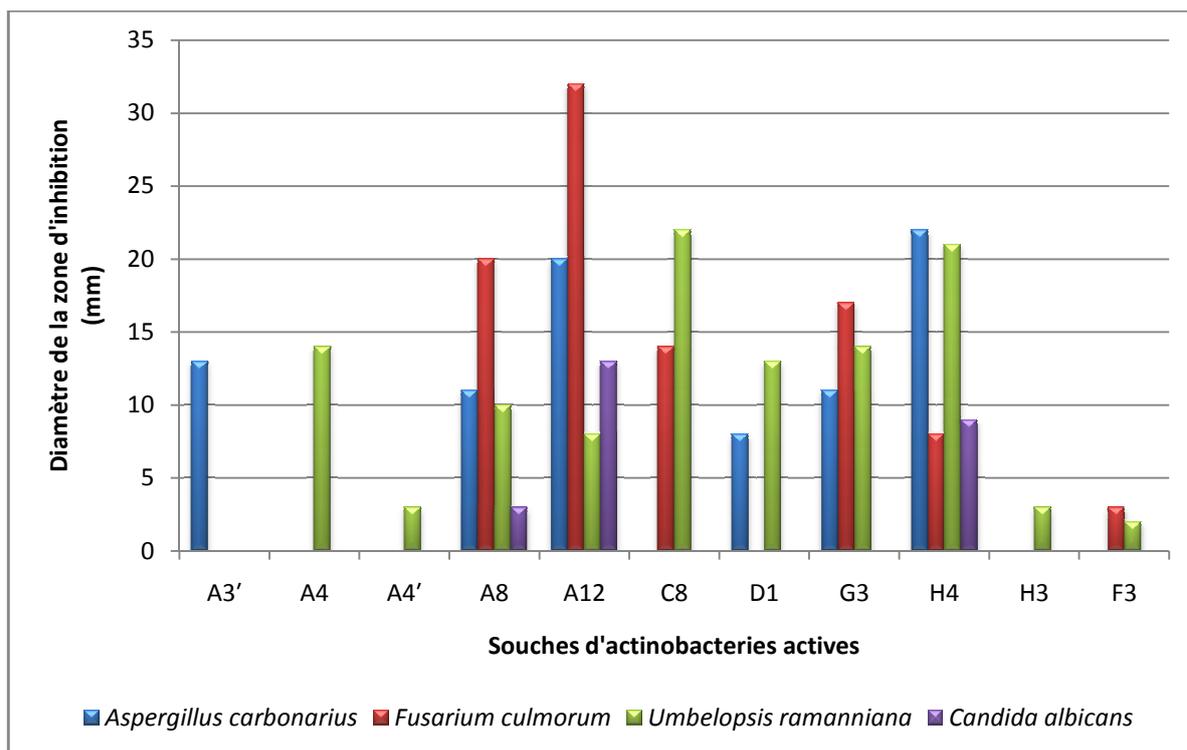


Figure 21.Activité antifongique des souches d'actinobactéries contre quelques champignons. (Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus)

Également, l'activité antibactérienne obtenue chez 10 souches (62,5 % des 16 souches) est généralement moyenne pour les souches de *Streptomyces* et faible pour les autres souches non *Streptomyces*. Une activité antibactérienne maximale très forte de 44 mm est obtenue, encore, par la souche A12 contre *B. subtilis*. L'activité maximale (29 mm) contre *S. aureus* résistante à la méthicilline (MRSA) a été obtenue par la souche C8 (Figure 22).

Nous remarquons que nos souches d'actinobactéries ont produit des antibactériens actifs contre *S. aureus* résistante à la méthicilline (MRSA) (50 % des souches) et contre *B. subtilis* (43,75 % des souches).

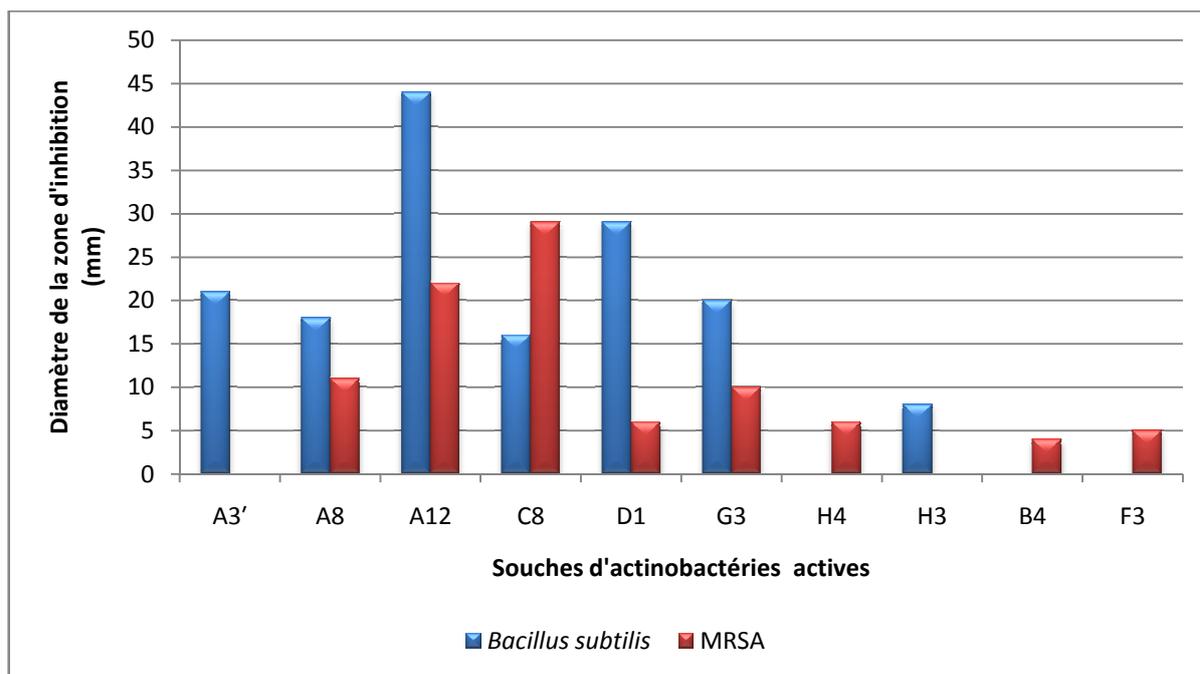


Figure 22. Activité antibactérienne des souches d'actinobactéries contre quelques bactéries à Gram positives. (Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus)

Nous avons remarqué certaines variations dans les activités des souches appartenant au même genre, comme c'est le cas des souches de *Streptomyces* (ex: entre A3' est active contre *B. subtilis* alors que H4 contre MRSA) et les souches de *Streptosporangium* (ex: H3 est active alors que les autres souches de ce genre ne sont pas actives).

2. Évaluation du potentiel antagoniste des souches d'actinobactéries sur des milieux synthétiques contenant une seule source de carbone

Pour chaque souche d'actinobactérie, nous avons considéré uniquement les milieux où la dégradation des sucres était positive (Tableaux 11 et 12). Les tests ont été effectués contre *S. aureus* résistante à la méthicilline (MRSA), *F. culmorum* et *C. albicans* (germes cibles ayant montré une sensibilité lors des tests sur le milieu ISP2).

Des résultats intéressants ont été obtenus par ces tests. En effet, 62,5 % des souches sont actives.

Concernant l'activité antifongique, 25 % des souches ont été actives contre *F. culmorum* avec production des activités maximales en présence de D- sorbitol pour la souche A8 (Figure 23), mélibiose, raffinose, salicin et tréhalose pour la souche A12 (Figure 24) (avec la meilleure activité), D-raffinose et D-tréhalose pour la souche C8 (Figure 25) et L-rhamnose pour la souche G3 (Figure 26). 12,5 % des souches ont montré une activité active contre *C. albicans*, avec des activités maximales en présence de tréhalose pour la souche A12 (Figure 24) et d'arabinose pour la

souche D8. Cette dernière étant la plus active sur cette levure n'avait montré aucune activité sur le milieu ISP2.

56,25 % des souches ont été actives contre MRSA. Les activités maximales obtenues selon la source de carbone sont en présence de: D-sorbitol pour la souche A8 (Figure 23), tréhalose pour les souches A12, C8 et G3 (Figures 24, 25 et 26 respectivement, D-glucose pour la souche A3' (Figure 27), D-lactose, D-mélibiose, L-rhamnose et maltose pour la souche A4 (Figure 28), raffinose pour A4' (cette souche était inactive sur le milieu ISP2), D-glucose, D-galactose, D-mélibiose, D-ribose, D-sorbitol et D-xylose pour la souche F3 (Figure 29), D-raffinose et D-fructose et L-arabinose pour la souche H4 (Figure 30). La souche A12 a montré l'activité la plus forte (24 mm).

Nous notons que la majorité des sucres testés permettent de produire des antibactérien et/ou des antifongiques contre au moins un germe cible testé à l'exception de certains sucres comme le sorbitol, le raffinose, le tréhalose ... etc. pour la souche A3' (Figure27) et le glucose et le lactose pour la souche F3 (Figure 29).

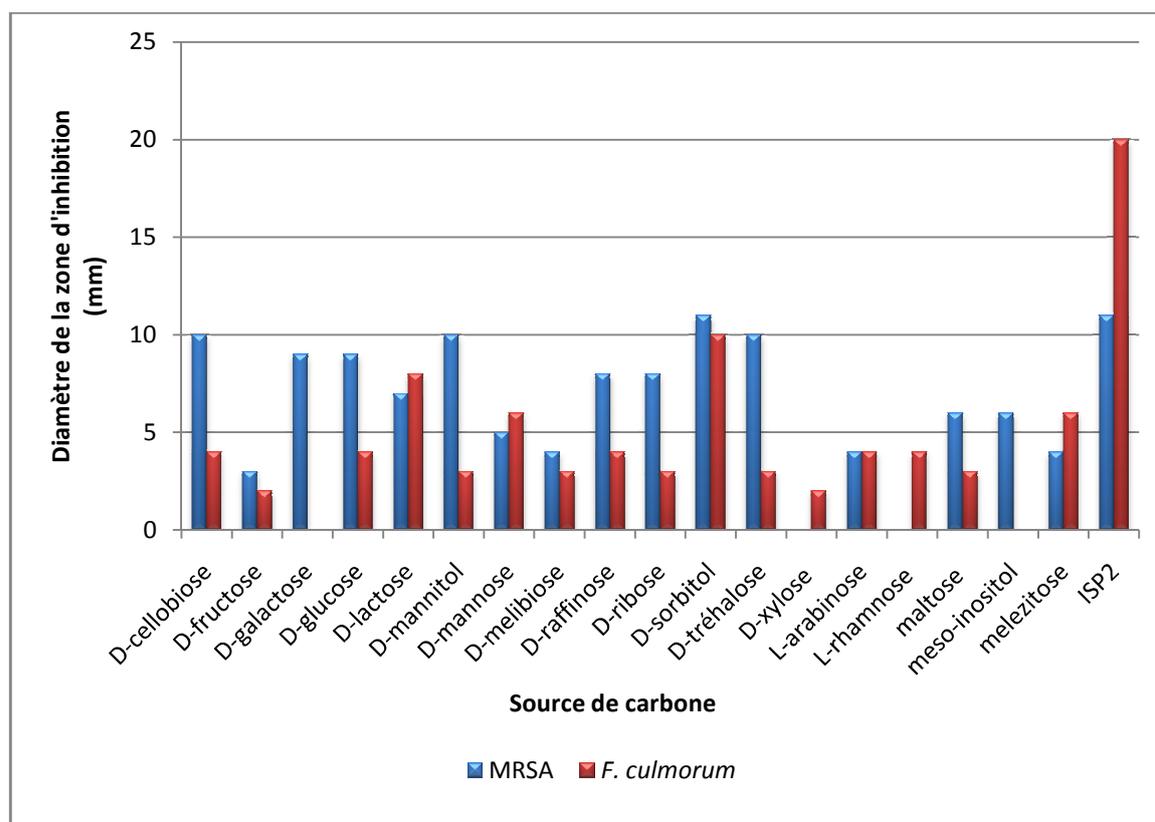


Figure 23. Activité antagoniste de la souche A8 contre MRSA et *Fusariumculmorum*.

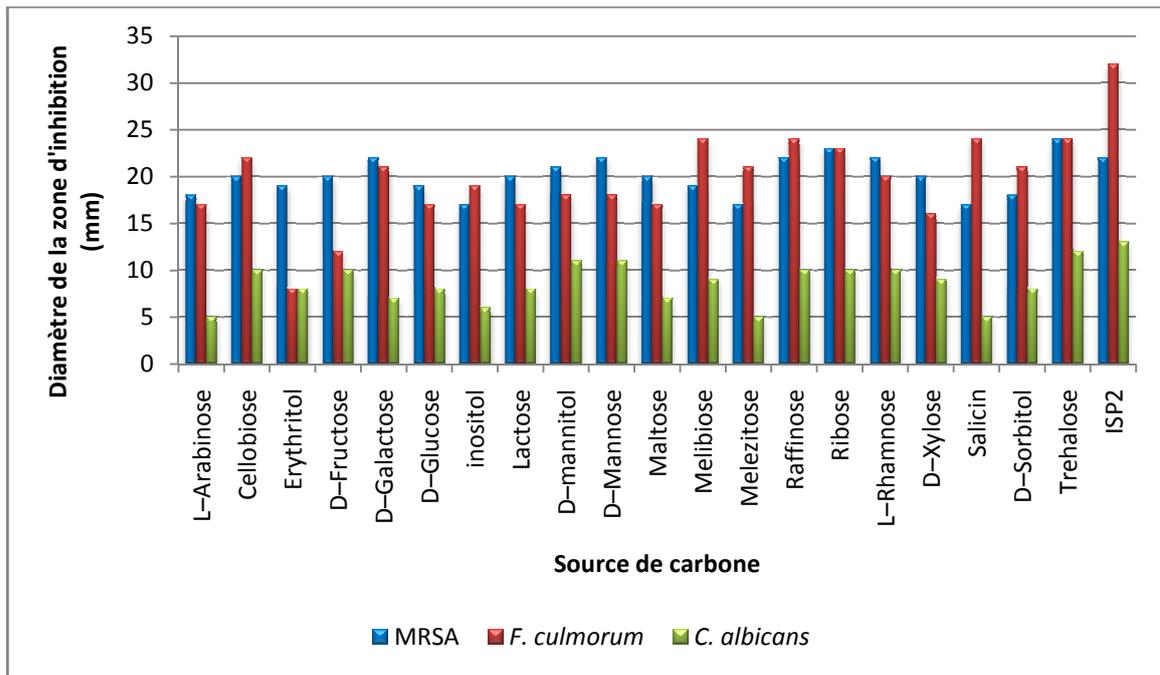


Figure 24. Activité antagoniste de la souche A12 contre MRSA, *F. culmorum* et *C. albicans*.

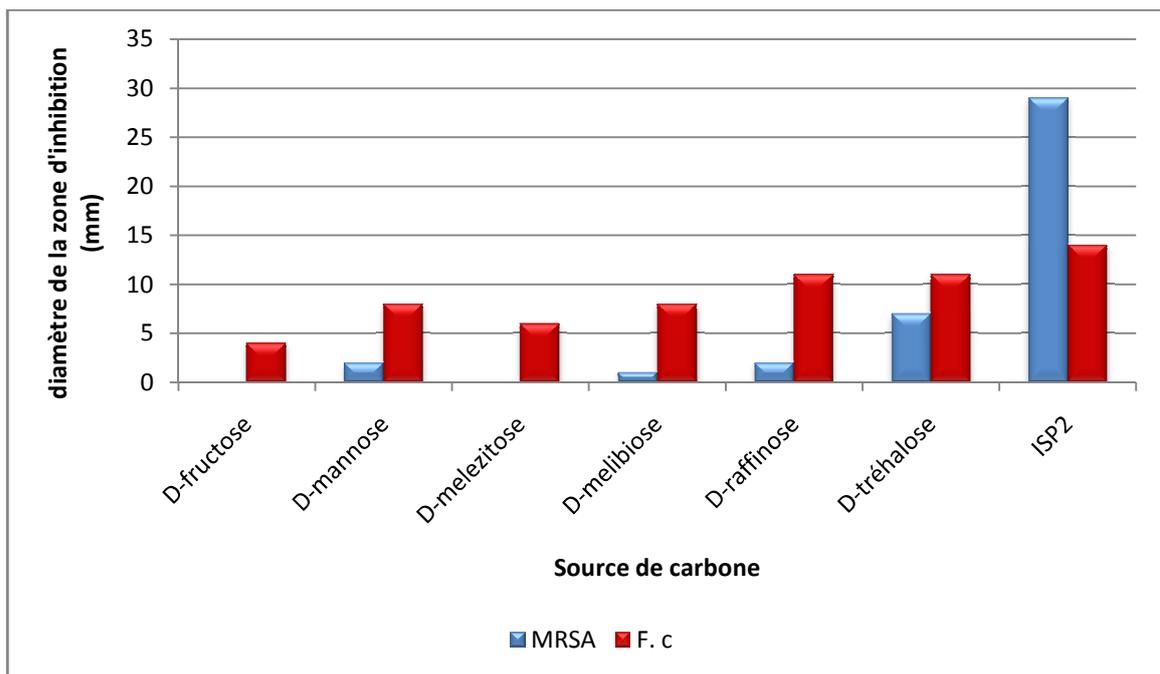


Figure 25. Activité antagoniste de la souche C8 contre MRSA.

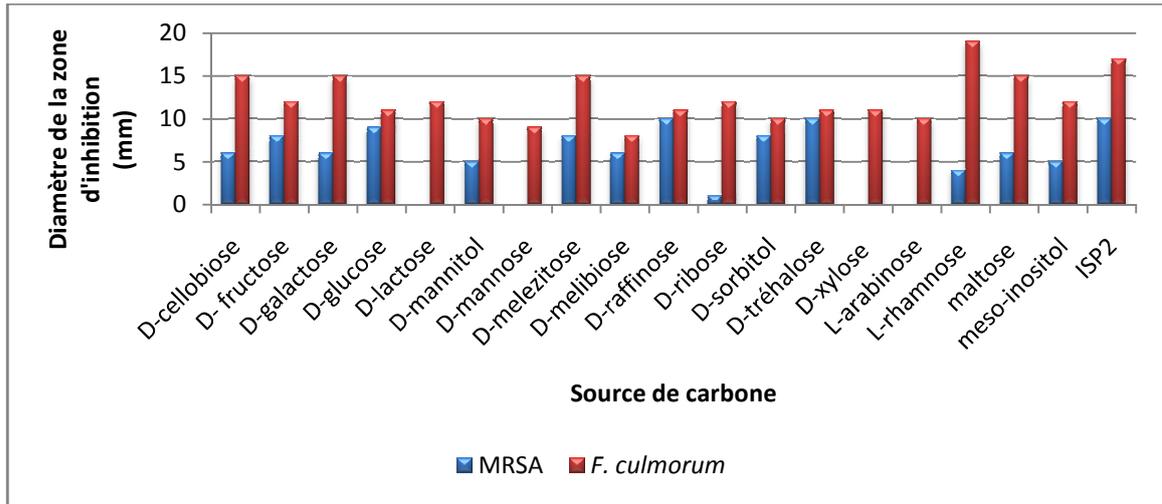


Figure 26. Activité antagoniste de la souche G3 contre MRSA et *Fusariumculmorum*.

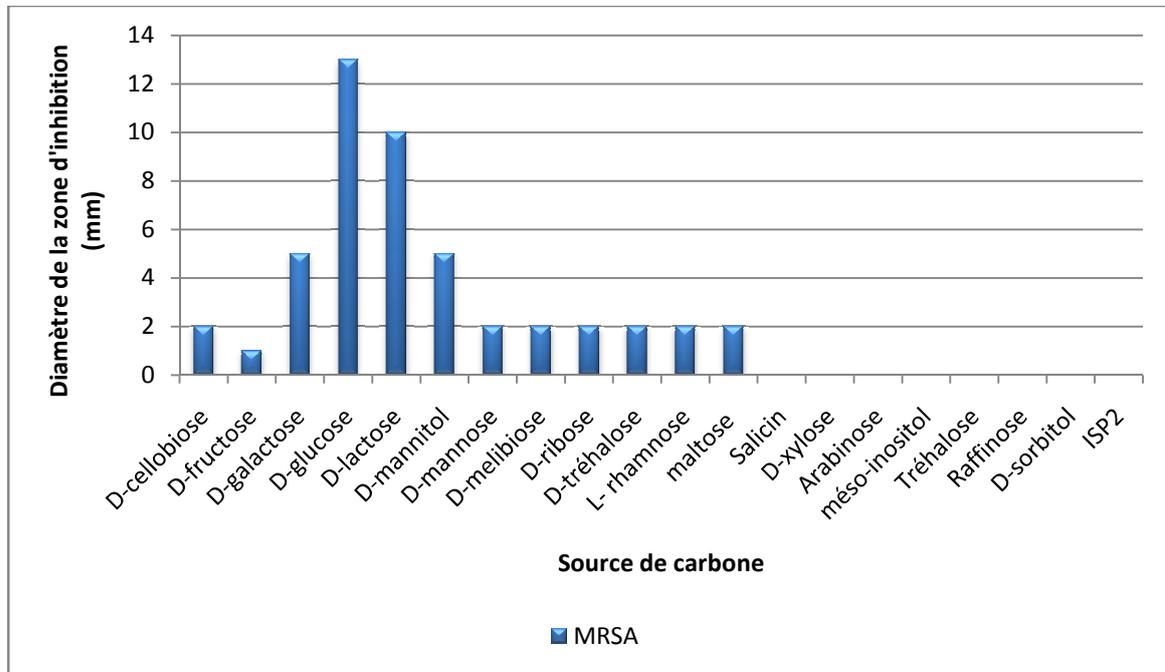


Figure 27. Activité antagoniste de la souche A3' contre MRSA.

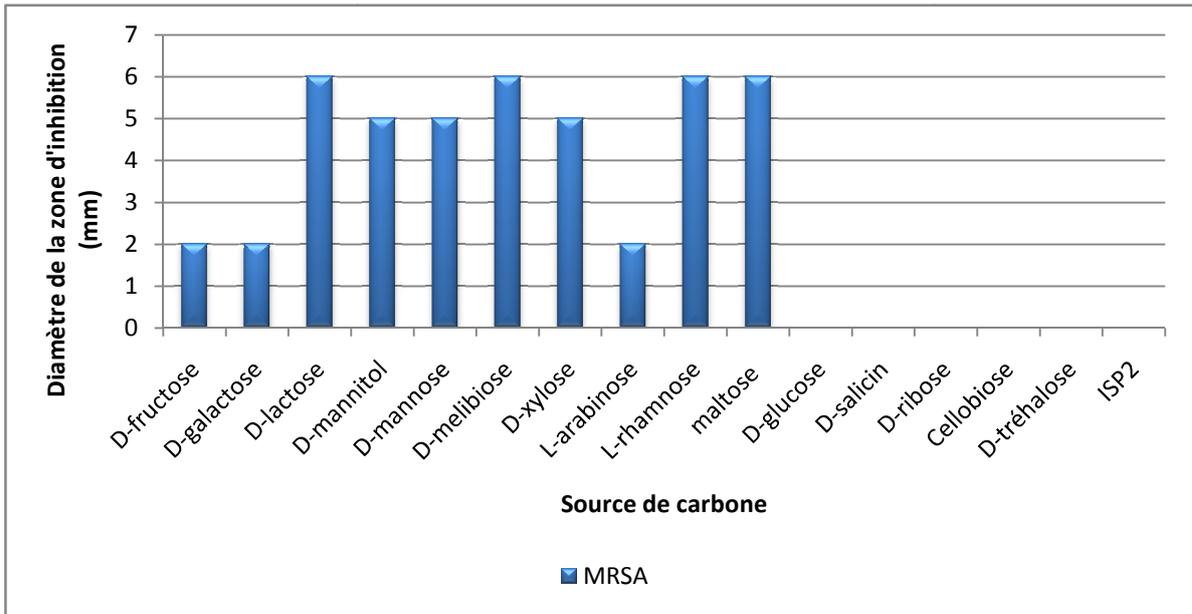


Figure 28. Activité antagoniste de la souche A4 contre MRSA.

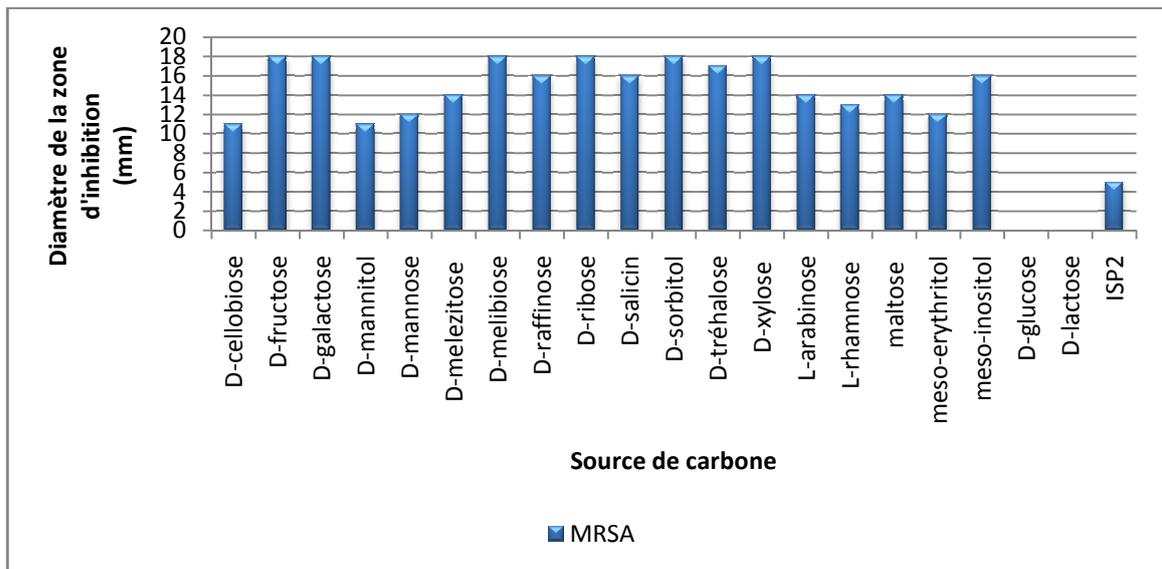


Figure 29. Activité antagoniste de la souche F3 contre MRSA.

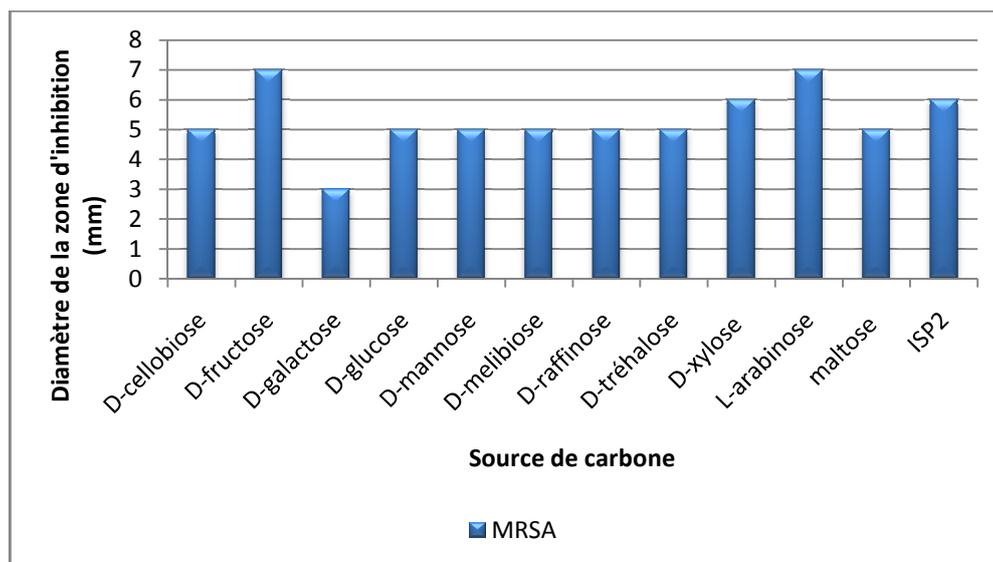


Figure 30. Activité antagoniste de la souche H4 contre MRSA.

3. Discussion

Sur le milieu ISP2, la plus grande sensibilité aux antibiotiques sécrétés par les souches d'actinobactéries est notée chez les bactéries à Gram positif en particulier *Bacillus subtilis*. Ce résultat concorde avec ceux d'Aouiche (2013) et Bouras (2013). Les bactéries à Gram négatif testées sont résistantes aux antibiotiques sécrétés par toutes nos souches. Ce phénomène de résistance des bactéries à Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif est déjà connu dans la littérature (Sabaouet *al.*, 1998; Prescott *et al.*, 2002; Meklat, 2012).

À l'exception des souches A4 et A4', les souches de *Streptomyces* possèdent des activités à la fois antibactériennes et antifongiques, ce qui démontre le spectre d'action large des membres de ce genre et leur réputation pour la production d'antibiotiques (Thakur *et al.*, 2007; Solecka *et al.*, 2012). Leur activité est variable suivant les microorganismes-cibles. Cette variabilité nous laisse ainsi penser à la sécrétion de plus d'un antibiotique par souche et qui seraient différents entre les souches.

L'activité antifongique la plus élevée a été obtenue par une souche de *Streptomyces* (A12) contre *F. culmorum*, un champignon pathogène des céréales mais aussi toxigène (Cavelier *et al.*, 1992; Demeke *et al.*, 2005), très largement répandu (Demeke *et al.*, 2005) particulièrement difficile à combattre lors d'infestation en plein champs et dont la production de toxines sur les grains contaminés est un problème potentiel pour la santé humaine et animale (Bensassi *et al.*, 2009). Alors, cela montre le rôle des *Streptomyces* spp. contre des champignons phytopathogènes et toxigènes comme c'est déjà décrit dans plusieurs travaux (Cao *et al.*, 2004; Patilet *et al.*, 2011). La même souche, A12, a montré la meilleure activité contre les bactéries à Gram positif.

La souche de *Nocardiopsis/ Saccharothrix* (F3) possède aussi une activité antifongique et antibactérienne. Meklat (2012), Zitouni(2005) et Sabaouet *al.*(1998), parmi les auteurs qui ont signalé que la grande majorité des isolats appartenant au genre *Nocardiopsis* sont actifs. Également, le genre *Saccharothrix* comporte des espèces productrices de plusieurs antibiotiques d'une grande diversité structurale et à spectre d'action intéressant (Takahashi *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 2000; Zitouni, 2005; Aouicheet *al.*, 2012). Le fait que ces deux sont parmi les genres rares, la possibilité d'obtenir des molécules bioactives nouvelles est encore élevé comme c'est remarqué dans les travaux de Gauzeet *al.*(1977), Engelhardt *et al.* (2010), Kinoshita *et al.*(1999) et Boubetra (2013).

Parmi nos souches de *Streptosporangium*, une seule souche a montré une activité antimicrobienne sur le milieu ISP2, cela ne concorde pas avec les résultats de Bouti (1997), Sabaou (1998), Boudjella (2007) et ChaabaneChaouche (2014) qui ont révélé des activités antimicrobiennes par toutes les souches qu'ils ont étudiées. De plus le genre *Streptosporangium* est connu pour la production des métabolites secondaires à activité divers (Umesawa *et al.*, 1976; Myhren *et al.*, 2013).

Le pourcentage des souches à activité antimicrobienne sur le milieu synthétique en variant les sucres a diminué, ce qui a montré l'importance d'une source de carbone plus complexe (comme c'est le cas dans le milieu ISP2) dans la production d'antibiotiques. La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure avec une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrans) (Lebrihiet *al.*, 1988a ; Lounès *et al.*, 1995a), les oligosaccharides (fructose, galactose, lactose) (Basak and Majumdar, 1973), que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol. En effet, pour la plupart des microorganismes producteurs, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la production comme nous l'avons remarqué pour le glucose dans le cas de la souche F3 (Larpenet et Sanglier, 1989 ; Martin and Demain, 1980). Pendant la phase de production, les cellules utilisent des sources d'énergie et de carbone lentement catabolisables (lactose par exemple, pour la production de la pénicilline; dextrine ou amidon pour la production de Macrolides) (Larpenet-Gourgand et Sanglier, 1992; Spížek et Tichý, 1995). Dans d'autres cas, La production d'antibiotiques demande que la source de carbone soit entièrement métabolisée ce qui impose l'utilisation de sucre facilement assimilable (Kimura, 1967; Komuneck, 1972; Hurley et Bialek; 1974; Kennel et Demain 1983). En effet, le glucose peut s'avérer être la meilleure source de carbone pour la production d'antibiotiques comme est le cas des dithiopyrrolones produites par *Saccharothrix algeriensis*(Lamari, 2006).

L'obtention d'une activité antifongique contre *C. albicans* par la souche D8 et la variabilité générale de l'activité antimicrobienne obtenue selon les sucres utilisés montre que la source de carbone utilisé peut induire la sécrétion des antibiotiques différents par la même souche d'actinobactérie.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La diversité des sols en actinobactéries cultivables et la recherche de nouveaux antibiotiques ont fait l'objet de plusieurs études dans le laboratoire de biologie des systèmes microbiens. Ces travaux ont abouti à la mise en évidence de la diversité des actinobactéries et la richesse de ces dernières en molécules bioactives, surtout les antibiotiques. En plus, ils ont abouti à la découverte de nouvelles espèces et la description de plusieurs nouvelles molécules bioactives.

Le présent travail rentre dans cette optique et a comme objectif l'étude taxinomique de quelques isolats d'actinobactéries isolés de sol et l'évaluation de leur potentiel à produire des molécules antimicrobiennes.

La caractérisation morphologique des isolats a permis de rattacher d'une manière présomptive; 9 isolats au genre *Streptomyces*, 3 isolats au genre *Streptosporangium*, 1 isolat au genre *Microbispora*, 1 isolat au genre *Nocardia* et 1 isolat aux genres *Nocardiopsis*/*Saccharothrix*. En revanche, 1 isolat n'a pu être affilié à aucun genre à ce stade d'étude.

Le calcul de l'indice de Sokal et Michener a été effectué en utilisant les résultats de 31 tests physiologiques effectués pour les 16 souches d'actinobactéries. Cet indice a suggéré l'appartenance de deux isolats de *Streptomyces* à la même espèce, définis à 93,5 % de similarité et l'appartenance des trois souches de *Streptosporangium* à la même espèce, définis à 90,3 et 93,5 % de similarité. Alors, la valeur de l'indice de Sokal et Michener a permis de suggérer le nombre d'espèces possibles par genre.

Le séquençage de l'ADNr 16S et l'étude phylogénétique de 13 souches ont permis de mettre en évidence la présence d'au moins 4 nouvelles espèces.

Les résultats du calcul de l'indice de Sokal et Michener correspondent parfaitement à ceux de l'étude moléculaire au niveau du genre *Streptomyces*. Ce n'est pas le cas au niveau de *Streptosporangium*.

Les résultats de l'étude taxinomique polyphasique ont permis d'enrichir la collection des actinobactéries par la découverte d'une nouvelle espèce de *Streptomyces* et trois nouvelles espèces de *Streptosporangium*.

L'étude du pouvoir antagoniste des souches d'actinobactéries 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 solide et le milieu synthétique constitué de quelques sucres contre plusieurs germes-cibles.

Les résultats du premier essaient révélé un potentiel important des souches à produire des molécules bioactives sur le milieu ISP2. En effet, 75 % des souches ont montré une activité antibiotique contre au moins un germe-cible. Cette activité est trouvée chez la majorité des genres identifiés mais elle est plus importante chez les genres *Streptomyces* et *Nocardiosis/ Saccharothrix* avec 100 % de souches actives. L'activité antibactérienne est observée seulement contre les bactéries à Gram positif. Une activité antifongique a été également obtenue mais elle est relativement moins importante que l'activité antibactérienne.

La deuxième étude sur le milieu synthétique a donné un pourcentage des souches actives (62,5 %) moins important par rapport au milieu ISP2. Cependant, une activité antimicrobienne a été obtenue chez certaines souches inactives sur le milieu ISP2.

Cette étude soutient l'opinion que le phylum *Actinobacteria* n'est pas encore exploité au maximum et donc il y a encore des nouvelles espèces d'actinobactéries qui pourraient représenter une source attirantede composés antimicrobiens. Aussi que la variation en sources de carbone dans le milieu de culture peut influencer la sécrétion de ces composés.

Le travail effectué ouvre des perspectives multiples qui concernent:

- Le séquençage de l'ARNr 16S des souches C8, D8 et F3 pour effectuer leur étude moléculaire.
- L'augmentation du nombre de tests physiologiques ou la recherches de tests discriminants pour faire une bonne séparation entre les souches de *Streptosporangium* par calcul de l'indice de Sokal et Michener.
- La réalisation des études chimiques pour les 4 nouvelles espèces pour finaliser leur description.
- La réalisation de l'hybridation ADN-ADN des souches ayant montré un pourcentage desimilarité relativement faible avec les espèces les plus proches.
- Réalisation de la cinétique de production des souches actives pour étudier les métabolites secondaires bioactives qui sont secrétés en optimisant les conditions de culture.

Introduction

Synthèse bibliographique

Matériel et méthodes

Résultats et discussions

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

A

- Accoceberry I. and Noël T.** (2007). - Antifongiques: cibles cellulaires et mécanismes de résistances. *J. Pharm. Clin.*, **3**:195–199.
- Al-Bari M. A., M. S. Bhuiyan, M. E. Flores, P. Petrosyan, M. Garcia-Varela and M. A. Islam.** (2005). - *Streptomyces bangladeshensis* sp. nov., isolated from soil, which produces bis-(2-ethylhexyl)phthalate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**: 1973–1977.
- Aouiche A.** (2013). - Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'Homme. Thèse de doctorat en microbiologie. École normale supérieure de Kouba-Alger.

B

- Baldacci E. and A. Grein.** (1966). - *Streptomyces avellaneus* and *Streptomyces libani*: two new species characterized by a hazel-nut brown (*Avellaneus*) aerial mycelium. *G. Microbiol.*, **14**: 185-198.
- Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K. H. and Beaulieu C.** (2002).- Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antibiotic activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**: 49-54.
- Barbara A. Brown-Elliott, June M. Brown, Patricia S. Conville and Richard J. Wallace Jr.** (2006) - Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *American Society for Microbiology*, pp. 259–282.
- Bauda P. et Monfort P.** (2004). – Agents pathogènes et modification des environnements: quels risques actuels et futurs? *Environnement, Risques et santé*, vol 3, pp 165-172.
- Beaman B. L., Burnside J., Edwards B. and Causey W.** (1976). - Nocardial infections in the United States, 1972-1974. *J Infect Dis.*, **134(3)**:286-289.
- 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.
- Becker B., Lechevalier M. P., Gordon R. and Lechevalier H.** (1964).- Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates. *J. Appl. Microbiol.*, **12**: 421-423.
- Becking J. H.** (1974). - Family III. *Frankiaceae*. In: *Bergey Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Eds. Buchanan R. E. and Gibbons N. E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701- 706.
- Bensassi F., El Golli-Bennour E., Abid-Essefi, S., Bouaziz, C., Hajlaoui, M.R. and Bacha, H.** (2009). - Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. *Toxicology*, **264**: 104-109.
- Berdy J.** (2005). - Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, **58 (1)**: 1-26.
- Berdy J.** (1989). - The discovery of new bioactive microbial metabolites: screening and identification. *Progress in industrial microbiology*, **27**:3-27.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** (2004) Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG (Eds). vol 4: Taxonomic Outline of the Prokaryotes. 2ème édition, Springer-Verlag, New York. 401 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition.** Volume 5 (2012). The Actinobacteria Editors: Whitman W. B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M. E., Ludwig W. Suzuki K.-I., Parte A. pp. 1750
- Boubetra D.** (2013). - Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrétés par *Saccharothrix* sp. Sa198. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A. and Mathieu F.** (2013). - Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, **168**: 223-230.
- Bouti K.** (1997). - Les genres rares *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora* et *Streptosporangium* (*Actinomycetales*) dans les sols sahariens; taxonomie numérique et étude de quelques-uns de leurs antibiotiques. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. Alger. 149 p.
- Boudjella H.** (2007). - Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique, El-Harrach. 188 p.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. and Vobi G.** (1989). - Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. In: *Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent J. P. et Sanglier J. J. (Eds.). Paris, Masson, pp. 33-70.

- Blanchard R.** (1896). - Parasites végétaux à l'exclusion des bactéries. In *Traité de Pathologie Générale*, vol. II (edited by Bouchard). G. Masson, Paris, pp. 811–932.
- Buchanan R. E.** (1916). - Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. The problem of bacterial nomenclature. *J. Bacteriol.*, **1**(6):591-596.

C

- Caboche S., Pupin M., Leclere V., Fontaine A., Jacques P., Kucherov G.** (2008). - NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res.*, **36**: 326-331.
- Caffrey P., Lynch S., Flood E., Finnan S. and Oliynyk M.** (2001). - Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem. Biol.*, **8**: 71-723.
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H. and Zhou S.** (2004). - Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Let. Appl. Microbiol.*, **39**: 425-430.
- Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H., Robison R., Condrón M. A. M., Stevens D. and Yaver D.** (2002). - Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology*, **148**: 2675-2685.
- Cavelier C., Maroquin C. and Steyer S.** (1992). - Les maladies des céréales. Fiches signalétiques. Centre de recherches agronomiques de Gembloux, 34 p.
- Chaabane Chaouch F., Bouras N., Mokrane S., Zitouni A., Schumann P., SprÖer C., Sabaou N. and Klenk H.-P.** (2016). - *Streptosporangium saharense* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *ijsem.*, pp. 1-6.
- Chamberlain K. and Crawford D. L.** (1999).- In vitro and in vivo antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 641-646.
- Chang C.C., Chen W.C., Ho T.F., Wu H.S. and Wei Y.H.**(2011).- Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **111**(5): 501–511. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.026>
- Chen Y. P., Mei R. and Lu S.** (1996). - The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: *Management of Soil-Borne Diseases* (Gupta V.K. and Utkhede R., eds), M/S Narosa, Kalayani Publisher, New Delhi, India, pp. 165-176.
- 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.
- Clark G. J., Langley D. and Bushell M. E.** (1995).- Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology*, **141**: 663-669.
- 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.
- Collins M. D. and Jones D.** (1981). - Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.*, **45**: 316 - 354.
- 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.
- Couch, J. N.** (1955). - A new genus and family of the Actinomycetales, with a revision of the genus Actinoplanes. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **71**: 148-155.
- Crawford D. L., Lynch J. M., Whipps J. M. and Ousley M. A.** (1993). - Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3899-3905.
- Cross T.** (1981). - Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**: 397-423.

D

- Demain A. L.** (2006). - From natural products discovery to commercialization: a success story. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**: 486-495.

- Demain A.L.** (1999). - Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Mini-review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**: 455-463.
- Deboer C., A. Dietz, G. M. Savage and W. S. Silver.** (1956). - Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. I. Biologic studies of streptolydigin. *Antibiot. Annu.* **3**: 886-892.
- Demeke T., Clear R.M., Patrick S.K. and Gaba D.** (2005). - Species-specific PCR based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Int. J. of Food Microbiology*, **103**: 271-284.
- Dommergues Y. et Mangenot F.** (1970). - Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.) Paris.
- Duangmal K., Mingma R., Pathom-aree W., Niyomvong N., Inahashi Y., Matsumoto A., Thamchaipenet A., Takahashi Y.** (2012). - *Microbispora thailandensis* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil. *J. Antibiot.*, **65**: 491-494.
- Duggar, B.M.** (1948). - Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**: 177-181.

E

- Engelhardt K., Degnes K. F., Kemmler M., Bredholt H., Fjaervik E., Klinkenberg G., Sletta H., Ellingsen T. E. and Zotchev S. B.** (2010). Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine *Nocardioopsis* species. *Appl Environ Microbiol.*, **76**(15): 4969-76.
- Elliott M., Shamoun S. F., Sumampong G., James D., Masri S. and Varga A.** (2009). - Evaluation of several commercial biocontrol products on European and North American populations of *Phytophthora ramorum*. *Biocontrol Sci. Technol.*, **99**: 1007-1021.
- El-Tarabily K. A. and Sivasithamparam K.** (2006).- Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.*, **38**: 1505-1520.
- El-Tarabily K. A., Hardy G. E. St. J. and Sivasithamparam K.** (2010). - Performance of three endophytic actinomycetes in relation to plant growth promotion and biological control of 139 *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. *Eur. J. Plant. Pathol.*, **128**: 527-539.
- El-Tarabily K. A., Hardy G. E. S. J., Sivasithamparam K., Hussein A. M. and Kurtböoke D. I.** (1997).- The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytol.*, **137**: 495-507.
- El-Tarabily K. A., Nassar A. H., Hardy G. E. S. J. and Sivasithamparam K.** (2009). - Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum* a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J. Appl. Microbiol.*, **106**: 13-26.
- Elwan S. H., Diab A. and Al-Gounaim Y.** (1985).- Ecology of the streptomycetes flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**: 99-104.
- Embley, M.T., J. Smida and E. Stackebrandt.** (1988). - The phylogeny of mycolateless wall chemotype-IV actinomycetes and description of *Pseudonocardioaceae* fam. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **11**: 44-52.
- Eppinger H.** (1891). - Über eine neue pathogene *Cladothrix* und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis (*Cladothrichia*). *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.*, **9**: 287-328.
- Errakhi R., Bouton F., Lebrihi A. and Barakate M.** (2007).- Evidence of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 1503-1509.

F

- Felsenstein J.** (1981). - Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, **17**: 368-76.
- Fischer A., Kroppenstedt R. M. and Stackebrandt E.** (1983). - Molecular genetic and chemotaxonomic studies on *Actinomadura* and *Nocardioopsis*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 3433-3446.
- Frommer, W.** (1959).- Zur Systematik Der Actinomycin Bildenden Streptomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, **32**: 187-206.

G

- Garcia L.S. and Isenberg H.D.** (2007). - Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd ed. Volume 2. Washington, D.C.
- Garrity, G.M. and J.G. Holt.**(2001). - The Road Map to the Manual. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 1, The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria* (edited by Boone, Castenholz and Garrity). Springer, New York, pp. 119–166.
- Gause, G. F. and M. A. Sveshnikova.** (1986). - Footnote f. *In* Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 22. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 573–576.
- Gauze G. F., Sveshnikova M. A., Ukholina R. S., Komarova G. N. and Bazhanov V. S.** (1997). - Formation of a new antibiotic, nocamycin, by a culture of *Nocardiopsis syringae* sp. nov. *Antibiotiki*, **22(6)**: 483-6.
- Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J., Vicente F.** (2010). - Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol*.
- González I., Ayuso-Sacido A., Anderson A., Genilloud O.** (2005). - Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMES Microbiol.Ecol.*, **54**: 401-415.
- Goodfellow M.** (1989). - Suprageneric classification of actinomycetes. *In*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. Williams ST, Sharpe ME and Holt JG (Eds.) Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 2333-2339.
- Goodfellow M.** (1985). - Actinomycete systematics: present and future prospects. Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology. Szabo G., Biro S. and Goodfellow M. (Eds.), pp. 487-496.
- Goodfellow M.** (1971). - Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **69**: 33-90.
- Goodfellow M. and Cross T.** (1984). - Classification. *In*: The Biology of the actinomycetes. Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (Eds.). Academic Press, London, pp. 7-164.
- Goodfellow M. and Simpson K.E.** (1983). - Ecology of streptomycetes. *Front. Appl. Microbiol.* **2**: 97–125.
- Goodfellow M. and Williams S. T.** (1983).- Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **37**: 189-216.
- Goodfellow M., Orlean P. A. B., Collins M. D., Alshamaony L. and Minnikin D. E.** (1978). - Chemical and numerical taxonomy of strains received as "*Gordona aurantiaca*". *J. Gen. Microbiol.*, **109**: 57-68.
- Goodfellow M., Stanton L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E.** (1990). - Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 19-36.
- Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M.** (1984). - Introduction to and importance of the actinomycetes. *In*: The biology of the actinomycetes. Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (Eds.). Academic Press, London, pp. 1-6.
- 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.
- Goshi K.T., Uchida A., Lezhava M., Yamazaki K., Hiratsu H., Shinkawa H. and Kinashi H.** (2006). - Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, **184**: 3411-3415.
- Groth I., Schumann P., Rainey F. A., Martin K., Schuetze B. and Augsten K.** (1997). - *Bogoriella caseilytica* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic actinomycete from a soda lake in Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**: 788-794.
- Grund E. and Kroppenstedt R. M.** (1990). - Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**: 5-11.
- Gürtler V. and Mayall B.C.** (2001). - Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 3-16.
- Gyaneshwar P., Naresh Kumar G., Parekh L. and Poole P.** (2002).- Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.*, **245**: 83-89.

H

- Hamdali H., Hafidi M., Virolle M. J. and Ouhdouch Y.** (2008).- Rock phosphate-solubilizing actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**: 2565-2575.
- Han C., Liu C., Zhao J., Guo L., Lu C., Li J., Jia F., Wang X. and Xiang W.** (2016). - *Microbispora camponoti* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the cuticle of *Camponotus japonicus* Mayr. *Antonie van Leeuwenhoek*, **109**: 215-223.

- Harvey I., Cormier Y., Beaulieu C., Akimov V.N., Meriaux A. and Duchaine C.** (2001).- Random amplified ribosomal DNA restriction analysis for rapid identification of thermophilic actinomycete-like bacteria involved in hypersensitivity pneumonitis. *Syst. Appl. Microbiol.*, **24**: 277-284.
- 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.
- He H., Zhang X., Wang H., Liu C., Wang S., Zhao J., Yuan J., Wang X. & Xiang W.** (2014). - *Streptosporangium nanhuense* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, **105**: 1025–1031.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T.** (1994). -In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ème édition, Williams and Wilkins editors, Baltimore. 816 p.
- Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K.-D., Mengü M., Jakobsen M., Steyn P.S., Teniola D. and Addo P.** (2002). - Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone. *PCT. Int. Appl.*, 19.

I

- Ilic S. B., Konstantinovic S. S., Todorovic Z. B., Lazic M. L., Veljkovic V. B., Jokovic N. and Radovanovic B. C.** (2010). - Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology*, **76**: 421-428.
- Intra, B., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Omura, S., Panbangred, W. & Takahashi, Y.** (2014). - *Streptosporangium jomthongense* sp. nov., an actinomycete isolated from rhizospheric soil and emendation of the genus *Streptosporangium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**: 2400–2406.
- Ishizawa S. and Araragi M.** (1976).- Composition of actinomycetes population in soil. In: Actinomycetes, the boundary microorganisms. Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, pp. 97-107.

J

- Jain P. K. and Jain P. C.** (2007). - Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. *Indian J. Exp. Biol.*, **45**: 203-206.
- Johnson J.L.** (1989). - Bacterial classification. III. Nucleic acids in bacterial classification. 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. 2306-2309.

K

- Kachuei R., Emami M., Mirnejad R. and Khoobdel M.** (2012). - Diversity and frequency of *Nocardia* spp. in the soil of Isfahan province, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, pp. 474-478.
- Khamna S., Yokota A. and Lumyong S.** (2009). - Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**: 649-655.
- Karthik L., Kumar G. and Rao K.V.B.** (2013). - Antioxidant activity of newly discovered lineage of marine actinobacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **6** (4): 325-332.
- Khan Z. U., Neil L., Chandy R., Chugh T. D., Al-Sayer H., Provost F. et al.** (1997). - *Nocardia asteroides* in the soil of Kuwait. *Mycopathologia*, **137**: 159-163.
- Kim M., Oh H. S., Park S. C. and Chun J.** (2014). - Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**: 346–351.
- Kim S. B., Lee J. Y. and Hwang B. K.** (1998). - Diversity of actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and sea-mud soils of Korea. *J. Microbiol.*, **36**: 86-92.
- 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.
- Kinoshita T., Yamada K., Hiraiwa N., Kondo M., Nishimura M. and Hara-Nishimura I.** (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.*, **19**(1): 43-53.

- Kiska D. L., Hicks K. and Pettit D. J.** (2002). - Identification of Medically Relevant *Nocardia* Species with an Abbreviated Battery of Tests. *American Society for Microbiology*, pp. 1346–1351.
- Kloepper J. W. and Schroth M. N.** (1978).- Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, vol. II (Station de Pathologie Végétale et Phyto Bactériologie, ed), Gilbert-Clarey, Tours, France, pp. 879-882.
- Kloepper J. W., Scher F. M., Laliberte M. and Tipping B.** (1986). - Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: Iron, Siderophores and Plant Diseases (Swinburne T. R., ed), Plenum, Publishing Corporation, New York, United States of America, pp. 155-164.
- Komaki H., Nemoto A., Tanaka Y., Takagi H., Yazawa K., Mikami Y., Shigemori H., Kobayashi J., Ando A., Nagata Y.** (1999). - Brasilicardin A, a new terpenoid antibiotic from pathogenic *Nocardia brasiliensis*: fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot.*, **52**:13–19.
- 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. and Evtushenko L. I.** (2006). - The family Nocardiopsaceae. In: The Prokaryotes. A handbook on biology of bacteria, 3rd edn. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (Eds). *Springer*. New York. pp. 754-795.
- Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. and Goodfellow M.** (1990). - Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **13**: 148-160.

L

- Labeda, D.P.** (1987). - Actinomycete taxonomy; generic characterization. *Dev. Ind. Microbiol.*, **28**: 115-121.
- Labeda D. P. and Lechevalier M. P.** (1989).- Amendment of the genus *Saccharothrix* (Labeda *et al.*, 1984) and description of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilisi* 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., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vannanneyt M., Swings J., Kim S. B. et al.** (2012).- Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie vanLeeuwenhoek*, **101**(1):73–104.
- Labeda D.P., Hatano, K., Kroppenstedt, R.M. and Tamura, T.** (2001). - Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Leechevalieria* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 1045-1050.
- Labeda D. P., Testa R. T., Lechevalier M. P. and Lechevalier H. A.** (1984). - *Saccharothrix*: new genus of the Actinomycetales related to *Nocardiopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 426-431.
- Lacey J.** (1997). - Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.*, **4**: 113-121.
- Lacey J.** (1973). - Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, **2**: 231-51.
- Lamari L.** (2006). - Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 186 p.
- Lasker B. A., Bell M., Klenk H. P., Spro"er C., Schumann P., Brown J. M.** (2014). - *Nocardia vulneris* sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **106**:543–553.
- Lechevalier M. P.** (1988).- Actinomycetes in agriculture and forestry. In "Actinomycetes in Biotechnology". Goodfellow M. G., Williams S. T. and Modarski M. eds., Academic Press London, New-York, pp: 327-358.
- Lechevalier M. P.** (1981). - Ecological associations involving actinomycetes. In: *Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, **11**: 159-166.
- Lechevalier H. A. and Lechevalier M. P.** (1970_a). A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In The Actinomycetales. Edited by H. Prauser. Gustav Fischer Verlag GmbH, Jena, Germany. pp. 393-405.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A.** (1970_b). - Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**: 435-443.
- Lechevalier M.P., De Bievre C., Lechevalier H.A.** (1977). - Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, **5**: 249-260.
- Lechevalier M.P., Prauser H., Labeda D.P. and Ruan J.S.** (1986). - Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 29-37.

- Lemmer H. and Kroppenstedt R. M.** (1984). - Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge. *Syst. Appl. Bacteriol.*, **5**: 124-135.
- Li C., Zhang Y., Liu C., Wang H., Zhao J., Li L., Zhang Z., Wang X. and Xiang W.** (2015). - *Microbispora bryophytorum* sp. nov., an actinomycete isolated from moss (Bryophyta). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**: 1274-1279.
- 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.** (1994). - Actinomycetes as plant pathogens. *Eur. J. Plant. Pathol.*, **100**: 179-200.
- Locci R.** (1976). - Developmental morphology of actinomycetes. In *Actinomycetes: The Boundary Microorganisms* (edited by Arai). Toppan, Tokyo, pp. 249-297.
- Lombardi P. and Crisanti A.** (1997).- Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. *Pharmacol. Ther.*, **76**: 125-133.
- Low C.-Y. and Rotstein C.** (2011). - Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicine Reports*, **3**: 14 (doi:10.3410/M3-14).
- Ludwig, W. and H.P. Klenk.** (2005). - Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays (edited by Brenner, Krieg, Staley and Garrity). Springer, New York, pp. 49-65.

M

- Maldonado, L., J.V. Hookey, A.C. Ward and M. Goodfellow** (2000). - The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia cummidelens* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 367-377.
- Marchal N., Bourdon J.L. and Richard Cl.** (1987). - Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin editor. Paris, pp. 67-122.
- Marchal N. et Bourdon J. L.** (1973). - Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds). Paris. 179 p.
- Mba C. C.** (1997).- Rock phosphate solubilizing *Streptosporangium* isolates from casts of tropical earthworms. *Soil Biol. Biochem.*, **29**: 381-385.
- Meisel C.** (1982).- Menaquinon-Muster als taxonomisches Merkmal bei Actinomycetales. M. S. Thesis technische Hochschule Darmstadt, German Federal Republic.
- Meklat A.** (2012). - Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat, École Normale Supérieure de Kouba - Alger.
- Meklat A., Sabaou N., Bouras N., Zitouni A., Spröer C., Klenk H-P., Mathieu F. and Lebrihi A.** (2012). - A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a saharan soil. *Annals of microbiology*, **62**: 1049-1057.
- Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F. and Lebrihi A.** (2011). - Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Appl. environ. Microbiol.*, **77**: 6710-4.
- Mertz, F.P. and R.C. Yao.** (1990). - *Streptosporangium carneum* sp. nov. isolate from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**: 247-253.
- Meyer, J.** (1976). - *Nocardiosis*, a new genus of order Actinomycetales. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**: 487-493.
- Minnikin D. E., Alshamaony L. and Goodfellow M.** (1975). - Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J. Gen. Microbiol.*, **88**: 200-204.
- Minnikin D.E., Hutchinson I.G. and Caldicott A.B.** (1980). - Thin layer chromatography of methanolysates of mycolic acid containing bacteria. *J. Chromatogr.*, **188**: 224-233.
- Minnikin D.E., O'Donnell A.G., Goodfellow M., Alderson G., Athalye M., Schaal A. and Parlett J.H.** (1984). - An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J. Microbiol. Meth.*, **2**: 233-241.
- Miyadoh S., Amano S., Tohyama H. and Shomura T.** (1990). - A taxonomic review of the genus *Microbispora* and a proposal to transfer two species to the genus *Actinomadura* and to combine ten species into *Microbispora rosea*. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 1905-1913.

- Moncheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N.** (2002). - Characteristics of soil actinomycetes from antarctica. *J. cult. Collect.*, **3**: 3-14.
- Mordarska H., Mordarska M. and Goodfellow M.** (1972). - Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **71**: 77-86.
- Moreira K.A., Albuquerque B.F., Teixeira M.F.S., Porto A. L. F., Lima F. J. L.** (2002). - Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18(4)**: 307-312.

N

- Nonomura, H. and Y. Ohara.**(1957). Distribution of actinomycetes in the soil. II. *Microbispora*, a new genus of the *Streptomycetaceae*. *J. Ferment. Technol.*, **35**: 307-311.
- Nonomura, H. and Y. Ohara.**(1960). - Distribution of actinomycetes in soil. V. The isolation and classification of the genus *Streptosporangium*. *J. Ferment. Technol.*, **38**: 405-409.

O

- 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.
- Okoro C. K., Brown R., Jones A. L., Andrews B. A., Asenjo J. A., Goodfellow M. and Bull A. T.** (2009). - Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile *Antonie Leeuwenhoek*, **95**: 121-133.
- Orchard, V.A.** (1981). - The ecology of *Nocardia* and related taxa. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Suppl.*, **11**: 167-180.

P

- 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.
- Patil H. J., Srivastava A. K., Kumar S., Chaudhari B. L. and Arora D. K.** (2010). - Selective isolation, evaluation and characterization of antagonistic actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**: 2163-2170.
- Patil H. J., Srivastava A. K., Singh D. P., Chaudhari B. L. and Arora D. K.** (2011). - Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. *Crop Prot.*, **30**: 1269-1273.
- Peltola J. S. P., Anderson M. A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R. M., Busse H. J., Salkinoja-Salonen M. S. and Rainey F. A.** (2001). - Isolation of toxigenic *Nocardioopsis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardioopsis* species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischoelae* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.*, **67**: 4293-4304.
- Poschner J., Kroppenstedt R.M., Fischer A. and Stackebrandt E.** (1985). - DNA-DNA reassociation and chemotaxonomic studies on *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Micropolyspora* and *Nocardioopsis*. *System. Appl. Microbiol.*, **6**: 264-270.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., Bacq-Calberg C. M. and Dusart J.** (2002). - Microbiologie, De Boeck University. pp.1147
- Pridham, T.G., C.W. Hesseltine and R.G. Benedict.** (1958). - A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Appl. Microbiol.*, **6**: 52-79.
- Promnuan Y., Kudo T. and Chantawannakul P.** (2009). - Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**: 1685-1689.
- Promnuan Y., Kudo T., Ohkuma M. and Chantawannakul P.** (2011). - *Actinomadura apis* sp. nov., isolated from a honey bee (*Apis mellifera*) hive, and the reclassification of *Actinomadura cremea* subsp. *rifamycinini* Gauze et al. 1987 as *Actinomadura rifamycinini* (Gauze et al. 1987) sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**: 2271-2277.

Q

- Quintana, E. & Goodfellow, M.** (2012).- Genus I. Streptosporangium. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 5, pp. 1811–1825. Edited by W. B. Whitman, M. Goodfellow, P. Kampfer, H. J. Busse, M. E. Trujillo, W. Ludwig, K. Suzuki & A. Parte. New York: Springer.

R

- Rademaker J.L.W., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Swings J., Vauterin L., Vauterin P. and Bruijn F.J.** (2000). - Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 665-677.
- 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.
- Ramos-Solano B., Jose Antonio Lucas García J. A. L., Garcia-Villaraco A., Algar E., Garcia-Cristobal J. and Mañero F. J. G** (2010). - Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Soil*, **334**: 189-197.
- 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 galilaeus* aclinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene*, **293**: 115-122.
- Rezenka T., Klanova K., Podojil M., Vanek Z.** (1984). - Fatty acids of *Streptomyces cinnamonensis*, producer of monensin. *Folia Microbiol.*, **29**: 217.
- Rong X. and Huang Y.** (2012). - Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Systematic and Applied Microbiology*, **35**: 7-18.

S

- 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.
- Saitou N. and Nei M.** (1987). - The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**: 406-425.
- 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.
- Sazak A, Sahin N, Guven K, Isik K, Goodfellow M.** (2011). - *Streptomyces samsunensis* sp. nov., a member of the *Streptomyces violaceusniger* clade isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**: 1309-14.
- Schottel J. L., Shimizu K. and Kinkel L. L.** (2001).- Relationships of in vitro pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biol. Control.*, **20**: 102-112.
- Schwarz S., Kehrenberg C. and Walsh T. R.** (2001). - Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **17**: 431-437.
- 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. *AntonieLeeuwenhoek*, **23**: 15-22.
- Singh M. P., Petersen P. J., Weiss W. J., Kong F. and Greenstein M.** (2000). - Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**: 2154-2159.
- Solanki R., Khanna M. and Lal R.** (2008). - Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Ind. J. Microbiol.*, **48**: 410-431.

- Solans M., Vobis G., Cassàn F. and Wall L. G.** (2009). - Saprophytic actinomycetes promote nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high N. *J. Plant Growth Regul.*, **28**: 106-114.
- Solans M., Vobis G., Cassàn F., Luna V. and Wall L. G.** (2011). - Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant *Ochetophila trinervis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**: 2195-2202.
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A.** (2012). - Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol.*, **7**: 373-390.
- Stach, J.E. and A.T. Bull.** (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **87**: 3-9.
- Stackebrandt E. and Goebel B. M.** (1994). - Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**: 846-849.
- Stackebrandt E. and Kroppenstedt R. M.** (1987). - Union of the genera *Actinoplanes* Couch, *Ampullariella* Couch and *Amorphosporangium* Couch in a redefined genus *Actinoplanes*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**: 110-114.
- Stackebrandt E. and Schumann P.** (2006). - Introduction to the taxonomy of *Actinobacteria*. *Prokaryotes*, **3**: 297-321.
- 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., Gurtler, H., et al.,** (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 viridogriseum* comb. nov., *Kutzneria kofuensis* comb. nov., and *Kutzneria albida* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Streptosporangium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**: 265-269.
- Stackebrandt E., Rainey F. A and Ward-Rainey N. L.** (1997). - A proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. syst. Bacteriol.*, **47**: 479-491.
- Stackebrandt E., Ludwig W., Schleifer K.H. and Cross H.J.** (1981_a). - Rapid cataloging of ribonuclease T1 resistant oligonucleotides from ribosomal RNAs for phylogenetic studies. *J. Mol. Evol.*, **17**: 227-236.
- Stackebrandt E., Winner-Fussl B., Fowler V. J. and Schillfer K. H.** (1981_b).- Deoxyribonucleic acid homologies and ribosomal ribonucleic acid similarities among spore forming members of the order *Actinomycetales*. *Int. Syst. Bacteriol.*, **31**: 420-431.
- Stapley E.O.** (1982). - Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolated from a soil in Japan. In: Trends in antibiotic research. Umezawa H., Demain A.L., Hata R. and Hutchinson C.R. (Eds.). Japan Antibiotic Research Association, Tokyo, pp. 154-170.
- Steingrube V.A., Wilson R.W., Brown B.A., Jost K.C., Blacklock Z., Gibson J.L. and Wallace R.J.** (1997). - Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinmadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *streptomyces* and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J. clin. Microbiol.*, **35**: 817-822.
- Strap J. L.** (2011). - Actinobacteria-Plant interactions: A boon to agriculture Chap. 13. In *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses* (Maheshwari D. K. ed.). pp. 285-309 Springer Heidelberg Dordrecht. London New York.
- Subramani R. and Aalbersberg W.** (2012). - Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, **167** (10): 571-580.
- Sun W., Zhang Y. Q., Huang Y., Zhang Y. Q., Yang Z.-Y., Liu Z. H.** (2009). - *Nocardia jinanensis* sp. nov., an amicoumacin B-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**: 417-420.
- Suzuki K., Goodfellow M. and O'Donnell A.G.** (1994). - Cell envelopes and classification. In *Handbook of New Bacterial Systematics* (edited by Goodfellow and O'Donnell). *Academic Press*, London, pp. 195-250.

T

- Taechowisan T., Peberdy J. F. and Lumyong S.** (2003). - Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Ann. Microbiol.*, **53** (4): 447-461.

- Takahashi A., Hotta K., Saito N., Morioka M., Okami Y. and Umezawa H.** (1986). - Production of novel antibiotic, dopsisamine by new subspecies of *Nocardioopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot.*, **39**: 175-183.
- Takahashi Y. and Omura S.** (2003). - Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **49** (3): 141-154.
- Tang S. K., Wang Y., Klenk H. P., Shi R., Lou K., Zhang Y. J., Chen C., Ruan J. S. and Li W. J.** (2011).- *Actinopolyspora albasp.* nov. And *Actinopolyspora erythraea* sp. nov., isolated from a salt field, and reclassification of *Actinopolyspora iraqiensis* Ruan et al. 1994 as a heterotypic synonym of *Saccharomonospora halophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**:1693-1698.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B. K. and Bora T. C.** (2007). - Isolation of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the state of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Mycol. Med.*, **17**: 242-249.
- Touati A.** (2006). - Caractérisation des phénotypes de résistance acquis aux β -lactamines des souches d'entérobactéries isolées dans les hôpitaux de Béjaia. Thèse de Doctorat. Université Abderrahmane Mira, Béjaia.
- Toumatia O.** (2010). - Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 115p.
- Trejo-Estrada S., Paszczynski A. and Crawford D. L.** (1998). - Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED9. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **21**: 81-90.
- Tsuboya S., Takayuki D., Takenori I. and Kenji H.** (1996).- Substance P antagonists manufacture with microorganism. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, **16**.
- Tsukamura M.** (1982). - Numerical Analysis of the Taxonomy of *Nocardiae* and *Rhodococci*. *Microbiol. Immunol.*, **26** (12): 1101-1119.

U

- Upadaya R. K. and Mukerji K. G.** (1999). -Biotechnological approaches in bio-control of plant pathogens. New York, Kluwer Academic.

V

- Valois D., Fayad K., Barasubiye T. and Beaulieu C.** (1996).- Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae*, the causal agent of raspberry root-rot. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1630-1635.
- Vandeputte P.** (2008). - Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de doctorat en biologie et organismes, université d'Angers. France.
- Vanechoutte M.** (1996). - DNA fingerprinting techniques for microorganisms. *Mol. Biotechnol.*, **6**: 115-143.
- Ventura, M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F. and Sinderen D. Van** (2007). - Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**: 495-548.
- Vetlugina L. A., Adiatova ZhF, Khozhamuratova SSh., Rymzhanova Z. A., Trenozhnikova L. P., Kopytina M. N.** (1990). - Isolation of Actinomycetales from the soil of Kazakhstan on selective media with antibiotics. *Antibiot Khimioter*, **35**: 3-5.
- Virgilio, A. and C. Hengeller.**(1960). - Produzione di Tetraciclina con *Streptomycespsammoticus*. *Farmaco, Edizione Scientifica*, **15**: 164-174.

W

- Waksman S.A.** (1961). - The actinomycetes. Classification, identification and descriptions of genera and species. Vol. 2. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 1-363.
- Waksman S. A.** (1950). - The Actinomycetes. Their nature, occurrence, activities, and importance. Chronica Botanica Company. Waltham, MA.
- Waksman S. A. and Woodruff H. B.** (1940). - Bacteriostatic and bactericidal substances produced by soil actinomycetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **45**: 609-614.

- Wawrik B., Kutliev D., Abdivasievna U. A., Kukor J. J., Zylstra G. J. and Kerkhof L.** (2007). - Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and central Asia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73** (9): 2982-2989.
- Wallace R. J., Brown B. A., Tsukamura M., Brown J. M., Onyi G. O.** (1991). - Clinical and laboratory features of *Nocardia nova*. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 2407–2411.
- Wayne L. G., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Moore W. E. C., Murry R. G. E., Stackebrandt E., Starr M. P. and Trüper H. G.** (1987). - Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**: 463-464.
- Wellington E. M. and Ul-Hassan A.** (2009). - *Actinobacteria*. Encyclopedia of Microbiology (Moselio Schaechter, Ed.), pp. 26-44, Oxford: Elsevier.
- Weyland H.** (1981). - Distribution of actinomycetes on the sea floor. In: « Actinomycetes » (Schaal K., Pulverer G., Eds). Zbl. Bakt. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York. Suppl., **11**: 185-193.
- Wezel G. P., Krabben P., Traag B. A., Keijser B. J. F., Kerste R., Vijgenboom E., Heijnen J. J. and Kraal B.** (2006). - Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 5283-5288.
- Williams S.T.** (1978). - Streptomyces in the soil ecosystem. In: *Nocardia and Streptomyces*. Mordarski M., Kurylowicz W. and Jeljaszewicz (Eds.), Fischer Verlag G., Stuttgart, pp. 137-144.
- Williams S.T. and Wellington E.M.H.** (1981). - The genus *Streptomyces* - A taxonomic enigma. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Suppl.*, **11**: 47-57.
- Williams, S. T., G. P. Sharples, J. A. Serrano, A. A. Serrano and J. Lacey.** (1976). - The micromorphology and fine structure of nocardioform organisms. In *The Biology of Nocardiae* (edited by Goodfellow, Brownell and Serrano). *Academic Press*, London, pp. 102–104.
- Williams, S.T., Lanning S. and Wellington E.M.H.** (1984). Ecology of actinomycetes. In *The Biology of Actinomycetes*, (edited by Goodfellow, Mordarski and Williams). *Academic Press*, London, pp. 481–528.

Y

- Yamaguchi T.** (1965). - Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **89**: 444-453.
- Yassin A. F., Galinski E. A., Wohlfarth A., Jahnke K. D., Schaal K. P. and Trüper H. G.** (1993). - A new actinomycete species, *Nocardiopsis lucentensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**: 266-271.
- Yekkour A., Sabaou N., Zitouni A., Errakhi R., Mathieu F. and Lebrihi A.** (2012). - Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils, and evaluation of their ability to control seedling blight of barley caused by *Fusarium culmorum*. *Lett. App. Microbiol.*, **55**: 427-435.
- 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.

Z

- 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.
- Zimmerman W.** (1990). Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.*, **13**: 129-130.
- Zitouni A.** (2005). - Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et de *Nocardiopsis* des sols Sahariens et nouvelles molécules bioactives secrétées par *Saccharthrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammreri de Tizi Ouzou, 230 p.
- Zitouni A.** (1995). - Les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (*Actinomycetales*) dans les sols sahariens: taxonomie numérique; extraction; purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 177 p.