

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEBDE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude

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

Thème

Recherche dans les sols algériens d'actinobactéries à activité antifongique

Soutenu le 20 /09/2017

PAR
BENMOUMOU Sarra

Devant le jury composé de :

KADRI F.	M.A.A. université de Blida 1	Présidente
BOUDJEMA N.	M.C.B. université de Blida 1	Examinatrice
MEKLAT A.	M.C.A université de Blida 1	Promotrice

Remerciements

Remerciant tout d'abord **le bon dieu** tout puissant de m'avoir donné la volonté et la force d'entamer et de terminer ce travail.

En premier lieu, j'aimerais remercier **Monsieur le Professeur Nasserline SABAOU, directeur de labo LBSM de Kouba (Alger)**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir mis à ma disposition les produits et le matériel nécessaire à la réalisation et la réussite de ce travail. Ses conseils, sa disponibilité, sa modestie, sa gentillesse et sa bonne humeur m'ont permis d'aller vers l'avant durant mon mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous portez à ce travail et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier également, mon encadrante **Dr. MEKLAT A.**, maître de conférences A à l'université de Blida et de lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir encadré pendant la durée de ce mémoire, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour ses remarques pertinentes et son optimisme. Ses qualités d'encadrant et son sens du détail m'ont permis d'avancer à un rythme régulier dans mes travaux et pour sa disponibilité et son écoute lors de mes requêtes. Je lui suis reconnaissante pour le temps qu'elle m'a consacré et toutes les opportunités qu'elles m'a offertes au cours de ce mémoire; je ne peux, madame, que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.

Je remercie également, **Mme KADRI F.**, MAA à l'Université Saâd Dahleb de Blida, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury auquel est soumise mon étude qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie **Dr. BOUDJEMA N.**, M C B. à l'Université Saâd Dahleb de Blida, Qu'il me soit ainsi permis de vous remercier très sincèrement pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à tous les membres du laboratoire LBSM, pour leur disponibilité, leurs conseils scientifiques, leur sympathie, leurs encouragements ainsi que pour l'ambiance agréable tout au long de ce stage.

Enfin, Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin qui ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Avant tout, nos sincères remerciements reviennent à Allah le tout puissant pour tous ses dons.

Je dédie affectueusement ce travail à

A l'être le plus cher au monde qui m'a poussé et motivé et n'a pas cessé de me fournir son soutien, qui m'a partagé sa patience et à qui je dois ma place pour ses sacrifices. Que dieu le protège et lui donne bonne santé Qu'il trouve dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.

A MON très cher PAPA

A celle qui m'a fait voir la lumière, qui m'a fait goûter la joie, qui m'a appris le sourire, qui a toujours été là pour moi, qui a veillé durant mes nuits pour faire la réussite de mes jours, à qui je dois tout et que rien ne suffira pour la remercier.

A MA très chère MAMAN

A ceux qui m'ont transmis leurs sagesses et leurs conseils, et qui m'ont appris de la vie et continuent à le faire,

A MES GRAND PARENTS

Aucun mot ne pourra jamais exprimer ma reconnaissance envers vous.

A Mes très chers et adorables frères bien aimés Mohamed Tidjani et Hadj Tayeb pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant, d'être coopératif et d'assumer à ma place certaine de mes responsabilités familiales.

A toute ma famille, A toutes les personnes que je connais et que je n'ai pas cité.

À toutes les personnes qui me sont chères

.....Je dédie ce travail

BENMOUMOU Sarra

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Liste de figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	3
1. Définition des actinobactéries	3
2. Ecologie des actinobactéries	4
3. Répartition des actinobactéries dans le sol	4
4. Critères d'identification des actinobactéries	5
4.1. Critères morphologiques.....	5
4.1.1. Caractéristiques macromorphologiques	5
4.1.2. Caractéristiques micromorphologiques	5
4.2. Critères chimiques : chimiotaxonomie	7
4.3. Critères physiologiques	9
4.4. Critères moléculaires	9
4.4.1. Analyse des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S	9
4.4.2. Hybridation ADN-ADN	9
4.4.3. Pourcentage en guanine-cytosine	9
5. Description morphologique de quelques genres d'actinobactéries.....	10
5.1. Le genre Streptomyces	10
5.2. Le genre Actinomadura	11
5.3. Le genre Saccharothrix.....	12

5.4. Le genre <i>Nocardiopsis</i>	13
5.5. Le genre <i>Nocardia</i>	13
5.6. Le genre <i>Amycolatopsis</i>	14
5.7. Le genre <i>Actinoplanes</i>	15
6. Isolement et sélection des genres d'actinobactéries mycéliennes	16
7. Importance des actinobactéries mycéliennes	16
7.1. Importance des actinobactéries dans les domaines pharmaceutiques et industriels.....	16
7.2. Importance des actinobactéries dans le domaine agronomique.....	17
8. Les antibiotiques	17
8.1. Les antibiotiques antibactériens.....	18
8.2. Les antibiotiques antifongiques.....	18
8.2.1. Classification	18
II. Matériel et méthodes	23
1. Sites d'études et prélèvement des échantillons de sols	23
2. Champignons-cibles	24
3. Souches d'actinobactéries témoins	25
Méthodes	25
1. Isolement et purification des actinobactéries.....	25
1.1. Milieux d'isolement	25
1.2. Ensemencement	26
1.3. Incubation	27
1.4. Sélection, purification et conservation des isolats d'actinobactéries	27
2. Caractérisation morphologique des isolats	28
2.1. Caractérisation macromorphologique.....	28
2.2. Caractérisation micromorphologique	28
3. Criblage de l'activité antifongique sur milieu solide.....	30
3.1. Préparation des cultures des actinobactéries.....	30
3.2. Préparation des suspensions des champignons-cibles.....	31

3.3. Mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des cylindres de culture	31
III. Résultats et discussion	32
1.1. Isolement et origine des actinobactéries mycéliennes	32
1.2. Caractérisation morphologique des actinobactéries mycéliennes et détermination présomptive des genres	34
1.2.1. Isolats du genre Streptomyces	34
1.2.2. Isolats du genre Actinomadura	36
1.2.3. Isolats du genre Saccharothrix.....	38
1.2.4. Isolats du genre Nocardiosis.....	39
1.2.5. Isolats du genre Nocardia	41
1.2.6. Isolats du genre Amycolatopsis.....	42
1.2.7. Isolats du genre Actinoplanes.....	44
1.3. Effet du milieu d'isolement sur la diversité des actinobactéries mycéliennes cultivables.....	45
1.4. Effet des agents sélectifs sur la diversité des actinobactéries mycéliennes.....	46
1.5. Distribution des genres dans les sols analysés.....	47
1.6. Discussion	48
2.1. Evaluation du potentiel antifongique des actinobactéries	52
2.2. Spectre d'activité des isolats d'actinobactéries.....	52
2.3. Potentiel antifongique des genres identifiés	53
2.3.1. Activité antifongique des isolats de Streptomyces	54
2.3.2. Activité antifongique des isolats d'Actinomadura	55
2.3.3. Activité antifongique des isolats de Saccharothrix.....	56
2.3.4. Activité antifongique de l'isolat de Nocardiosis	57
2.3.5. Activité antifongique des isolats de Nocardia	57
2.3.6. Activité antifongique des isolats d'Amycolatopsis	58
2.3.7. Activité antifongique des isolats d'Actinoplanes	58
2.4. Discussion	59
Conclusion et perspectives.....	64
Références bibliographiques	66
Annexe	91

Liste de figures

Figure 1. Micromorphologie de quelques espèces d'actinobactéries appartenant à différents genres.	6
Figure 2. Morphologie des chaînes de spores des espèces de <i>Streptomyces</i> (Hütter, 1967).	11
Figure 3. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage	12
Figure 4. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de <i>Sa. algeriensis</i> SA 233 ^T (Zitouni <i>et al.</i> , 2004).	12
Figure 5. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage du mycélium de l'espèce <i>Nocardiopsis valliformis</i> HBUM 20028 ^T (Yang <i>et al.</i> , 2008).	13
Figure 6. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de deux espèces du genre <i>Nocardia</i> (Kageyama <i>et al.</i> , 2004).	14
Figure 7. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage	15
Figure 8. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage des sporanges sur le mycélium du substrat de deux espèces du genre <i>Actinoplanes</i> (Nurkanto <i>et al.</i> , 2015).	15
Figure 9. Structure chimique de certains antibiotiques antifongiques (Anderson, 2005).	19
Figure 10. Mécanismes d'action de certains antifongiques (Ostrosky-Zeichner, 2010).	22
Figure 11. Mode d'action du composé antifongique, l'amphotéricine B (AmB) (Lohner, 2014).	22
Figure 12. Carte d'Algérie montrant les régions d'échantillonnage des sols (http://d-maps.com/index.php?lang=fr).	23
Figure 13. Technique de préparation des dilutions décimales et d'ensemencement.	27
Figure 14. Technique de purification et de conservation des isolats d'actinobactéries.	28
Figure 15. Observation macroscopique à l'œil nu (a) et microscopique (b) des colonies des actinobactéries.	29
Figure 16. Etapes suivies pour l'obtention des isolats d'actinobactéries.	30
Figure 17. Méthode des cylindres d'agar contenant les cultures (Nalubega, 2016).	31
Figure 18. Micromorphologie du mycélium aérien des isolats Bm7 à gauche et Bm16 à droite poussant sur le milieu ISP2et observée au microscope photonique (G x100 avec effet de zoom). ...	35
Figure 19. Aspect du mycélium aérien des isolats Mg13, Mg15, Mg16 et Mg17.	36
Figure 20. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat.	37
Figure 21. Aspect du mycélium aérien des isolats Mg63 et Mg66.	38

Figure 22. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat Mg 75	38
Figure 23. Aspect du mycélium aérien de l'isolat Mg75.	39
Figure 24. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat Mg12 poussant	40
Figure 25. Aspect du mycélium aérien de l'isolat Mg12.	41
Figure 26. Micromorphologie du mycélium du substrat (MS) de l'isolat Mg64 poussant sur le milieu ISP2 et observée au microscope photonique (G x 400 avec effet de zoom). La fragmentation (en zig-zag) du MS est excessive.	41
Figure 27. Aspect du mycélium aérien de l'isolat Mg22.	42
Figure 28. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat Bm48 poussant.....	43
Figure 29. Aspect du mycélium aérien de l'isolat Bm48.	44
Figure 30. Micromorphologie du mycélium du substrat montrant	44
Figure 31. Aspect du mycélium du substrat des isolats Bm42, Bm45 et Bm46.	45
Figure 32. Répartition des isolats appartenant au genre <i>Streptomyces</i> et à d'autres genres selon les milieux d'isolement.	46
Figure 33. Répartition des genres d'actinobactéries selon les milieux d'isolement.	47
Figure 34. Distribution des genres d'actinobactéries identifiés dans les sols analysés.	48
Figure 35. Fréquence des souches actives.	52
Figure 36. Spectre d'activité des isolats d'actinobactéries.	52
Figure 37. Fréquence de l'activité antifongique des isolats d'actinobactéries en fonction des champignons-cibles.	53
Figure 38. Activité antifongique de quelques souches d'actinobactéries contre les champignons-cibles.	53
Figure 39. Nombre d'isolats d'actinobactéries actives par genre.	54
Figure 40. Activité antifongique des souches de <i>Streptomyces</i> à chaînes de spores de type S, SRA et RF, contre quelques champignons. Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus.	55
Figure 41. Activité antifongique des souches d' <i>Actinomadura</i> contre quelques champignons.	56
Figure 42. Activité antifongique des souches de <i>Saccharothrix</i> contre quelques champignons.	56
Figure 43. Activité antifongique de la souche Mg12 de <i>Nocardiopsis</i> contre quelques champignons. Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus.	57
Figure 44. Activité antifongique des souches de <i>Nocardia</i> contre quelques champignons.	57

Figure 45. Activité antifongique des souches d' <i>Amycolatopsis</i> contre quelques champignons.	58
Figure 46. Activité antifongique des isolats d' <i>Actinoplanes</i> contre quelques champignons.	59

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux critères utilisés pour la chimiotaxonomie des actinobactéries.	8
Tableau 2. Biocontrôle de certaines maladies fongiques par les actinobactéries mycéliennes autres que <i>Streptomyces</i> (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).	17
Tableau 3. Maxima d'absorption en UV-visible des macrolides polyéniques (Martin, 1979).	20
Tableau 4. Situation géographique des régions d'échantillonnage.	23
Tableau 5. Champignons-cibles utilisés.	24
Tableau 6. Actinobactéries témoins.	25
Tableau 7. Milieux d'isolement et agents sélectifs.	26
Tableau 8. Origine des isolats d'actinobactéries mycéliennes sélectionnés selon les sols et les milieux utilisés.	33
Tableau 9. Répartition des isolats d'actinobactéries selon les genres correspondants.	34
Tableau 10. Caractéristiques culturelles des souches de <i>Streptomyces</i>	35
Tableau 11. Caractéristiques culturelles des isolats d' <i>Actinomadura</i>	37
Tableau 12. Caractéristiques culturelles des isolats de <i>Saccharothrix</i>	39
Tableau 13. Caractéristiques culturelles des isolats de <i>Nocardiopsis</i>	40
Tableau 14. Caractéristiques culturelles des isolats de <i>Nocardia</i>	42
Tableau 15. Caractéristiques culturelles des isolats d' <i>Amycolatopsis</i>	43
Tableau 16. Caractéristiques culturelles des isolats d' <i>Actinoplanes</i>	45

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
%	pourcentage
DAP	acide diaminopimélique
DAB	acide 2,4 diaminobutyrique
PE	phosphatidyléthanolamine
PC	phosphatidylcholine
PG	phospholipides contenant de la glucosamine
PGI	phosphatidylglycérol
V	variable
Orn	ornithine
Gly	glycine
Lys	lysine.
G+C	guanine +cytosine (Coefficient de Chargaff)
MA	mycélium aérien
MS	mycélium du substrat
PS	pigment soluble
ND	non déterminé
ARN	acide ribonucléique
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ARNr 16S	acide ribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S
S	<i>Spira</i>
RA	<i>Retinaculum Apertum</i>
RF	<i>Rectus Flexibilis</i>
Bm	sol de Boumerdès
Mg	sol de Mostaganem
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project (milieu de culture)
CH-V	chitine - vitamines B-Agar
GAA	glycérol-asparagine-agar

Résumé

L'analyse de deux échantillons de sols provenant des régions de Boumerdès et Mostaganem a permis de récolter 88 isolats d'actinobactéries sur les milieux « chitine- agar » et « glycérol-asparagine-agar » additionnés de vitamines B et d'agents sélectifs.

Les isolats obtenus ont fait l'objet d'une étude taxonomique basée sur les critères macro et micro-morphologiques. Cette étude a montré une diversité importante des actinobactéries dans les sols étudiés. Le sol de Mostaganem s'est montré plus riche en actinobactéries du point de vue du nombre d'isolats sélectionnés (54 isolats) et de la diversité des genres (6 genres) par rapport au sol de Boumerdès (34 isolats appartenant à 4 genres).

Les souches ont été rattachées d'une manière présomptive à 7 genres différents dont la majorité appartient au genre *Streptomyces* (51 souches) qui est le genre le plus fréquent du sol. Les 37 autres isolats ont été identifiées à 6 genres peu fréquents à rares : *Actinomadura* (2 souches), *Saccharothrix* (12 souche), *Nocardiopsis* (2 souches), *Amycolatopsis* (6 souches), *Nocardia* (12 souche) et *Actinoplanes* (3 souches).

L'activité antifongique des 88 souches d'actinobactéries cultivées sur le milieu ISP2 solide a été évaluée contre 4 champignons filamenteux phytopathogènes et/ou toxigènes et une levure pathogène pour l'homme par la technique des cylindres d'agar. Parmi les 88 souches d'actinobactéries 63 (74%) ont montré une activité antifongique contre au moins un champignons-cible. L'activité antifongique a été estimée à 100% chez *Actinomadura* et *Actinoplanes*, 83,33% chez *Amycolatopsis*, 72,55 chez *Streptomyces*, 66,66% chez *Nocardia*, 58,33% chez *Saccharothrix* et 50% chez *Nocardiopsis*. Cette étude a révélée qu'une souche nommée Bm21 possède les meilleures activités antifongiques contre tous les champignons cibles testés avec des diamètres d'inhibition allant de 15 à 22 mm.

La majorité des métabolites antifongiques sécrétées par nos souches d'actinobactéries ont une action contre *Aspergilles carbonarius*, *Fusarium culmorum* et *Phaeoconiella chlamydospora* (36 à 40 souches actives contres ces champignons). Par contre, peu de souches ont montré une activité contre *Phaeoacremonium aleophilum* et *Candida albicans* (7 à 12 souches actives uniquement).

Mots clés : Actinobactéries, sol, isolement, caractérisation morphologique, activité antifongique.

Abstract

Analysis of two soil samples collected from Boumerdès and Mostaganem regions enabled to harvest 88 isolates of actinobacteria on "chitin-agar" and "glycerol-asparagine-agar" media supplemented with vitamin B and some selective agents.

The isolates obtained were subjected to a taxonomic study based on their macro and micro-morphological criteria. This study showed a significant diversity of actinobacteria in the studied soils. The soil of Mostaganem showed richness in actinobacteria in terms of the number of isolates selected (54 isolates) and species diversity (6 genera) compared to the soil of Boumerdes (34 isolates belonging to 4 nationalities). The strains were presumptively attached to 7 different genera, the majority belonging to the genus *Streptomyces* (51 strains), which is the most frequent genus from soil. The other 37 isolates were identified to 6 infrequent to rare genera: *Actinomadura* (2 strains), *Saccharothrix* (12 strains), *Nocardiopsis* (2 strains), *Amycolatopsis* (6 strains), *Nocardia* (12 strains) and *Actinoplanes* (3 strains).

Antifungal activity of the 88 strains of actinobacteria cultured on solid ISP2 medium was evaluated against 4 phytopathogenic and / or toxigenic filamentous fungi and 1 yeast pathogen for man by the technique of agar cylinders. Among the 88 strains of actinobacteria, 63 (74%) showed antifungal activity against at least one of the target fungi. Antifungal activity was estimated to be 100% for *Actinomadura* and *Actinoplanes*, 83.33% for *Amycolatopsis*, 72.55 for *Streptomyces*, 66.66% for *Nocardia*, 58.33% for *Saccharothrix* and 50% for *Nocardiopsis*. This study revealed that a strain named Bm21 possesses the best antifungal activities against all the target fungi tested with inhibition diameters ranging from 15 to 22 mm.

The majority of the antifungal metabolites secreted by our actinobacteria strains had an action against *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum* and *Phaeoconiellachlamydospora* (36 to 40 strains active against these fungi). In contrast, few strains showed activity against *Phaeoacremonium aleophilum* and *Candida albicans* (7-12 active strains only).

Keywords: Actinobacteria, soil, isolation, morphological characterization, antifungal activity

ملخص

سمح تحليل عينتين من التربة الأتية من منطقتي مستغانم وبومرداس بجمع 88 عزلة من البكتيريا الهيفية باستعمال الوسطين كتين فيتامين أ غار وجليسيرول أسبراجين ا غار المضافاليهما فيتاميناتمنوعبوعوامل العزلالانتقائي.

شكلت هذه العزلات موضوع دراسة أولية للتصنيف على أساس الماكرو والميكرو مورفولوجيا. أوضحت هذه الدراسة التنوع المهم للبكتيريا الهيفية للأتربة المدروسة. أظهرت تربة مستغانم ثراء في الأكتينوبكتيريا من حيث عدد العزلات المختارة (54 عزلة) وتنوع الأجناس (6 جنسا) مقارنة بتربة بومرداس (34 عزلة تنتمي إلى 4 جنسيات). تم إنساب هاته السلالات بشكل إفتراضي الى 7 أجناس مختلفة معظمها ينتمي الى جنس *Streptomyces* (51 سلالة) الذي يمثل الجنس الأكثر شيوعا في التربة. أما باقي السلالات 37 سلالة قد تم إنسابها الى 6 أجناس منغير مألوفة الى نادرة: *Actinomadura* (سلالتين)، *Saccharothrix* (12 سلالة)، *Nocardiosis* (سلالتين)، *Amycolatopsis* (6 سلالات)، *Nocardia* (12 سلالة) و *Actinoplanes* (3 سلالات).

تم تقييم النشاط المضاد للفطريات ل88 سلالة من الأكتينوبكتيريا المزروعة على وسط صلب ضد 4 فطريات ممرضة للنبات و\أو المفرزة للميكوتوكسينات وخميرة ممرضة للإنسان وذلك إعتما على تقنية أسطوانات الأغار. 63 بكتيريا هيفية من بين 88 لهم القدرة على إنتاج المضادات الفطرية. قدر النشاط المضاد للفطريات ب: 100% عند *Actinoplanes* و *Actinomadura* و 83,33% عند *Amycolatopsis* و 72,55% عند *Streptomyces* و 66,66% عند *Nocardia* و 58,33% عند *Saccharothrix* و 50% عند *Nocardiosis*. بينت هذه الدراسات بان السلالة Bm21 تتميز بأحسن نشاط مضاد ضد كل الفطريات التي تم إختبارها بأقطار تثبيط تقدر من 15 الى 22 مم.

غالبية المستقبلات المضادة للفطريات المفرزة من طرف سلالات الأكتينوبكتيريا المدروسة لها نشاط ضد *Aspergillus carbonarius* و *Fusarium culmorum* و *Phaeomoniella chlamydospora* من 36 الى 40 سلالة نشيطة ضد هذه الفطريات). ولكن عدد قليل من سلالات الأكتينوبكتيريا أظهرت نشاطها ضد *chlamydospora* و *Phaeomoniella* و *Candida albicans* (من 7 الى 12 سلالة نشيطة فقط).

الكلمات المفتاحية: أكتينوبكتيريا، التراب، عزل، الوصفالمورفولوجي، القدرةالتضادية

Introduction

Introduction

Les actinobactéries sont un groupe de micro-organismes eubactériens que l'on trouve couramment dans le sol et qui semblent être fortement impliqués dans l'écologie de cet habitat tel que la transformation des biopolymères complexes comme la lignocellulose, l'hémicellulose, la pectine, la kératine et la chitine (Saravanamuthu, 2010; Allen *et al.*, 2005). Ce sont des bactéries à Gram positif qui ont une teneur en guanine et cytosine supérieur à 55% (Govind *et al.*, 2014; Se-Kwon, 2015); avec des possibilités métaboliques très diverses assurées par leur génome extrêmement important (Goshi *et al.*, 2002). Leur aptitude de colonisation, leur adaptation, leurs résistances à certaines conditions hostiles ainsi que leur capacité à produire de nouveaux composés importants dans divers secteurs font que ces actinobactéries constituent l'objet de nombreuses études (Se-Kwon, 2015).

Les champignons sont à l'origine de très nombreuses maladies végétale et humaine. Selon l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2008) les maladies des plantes causent annuellement une réduction de la production mondiale de l'ordre de 12 à 14%. Cette même organisation estime que 70% de ces dégâts sont imputables aux seuls champignons phytopathogènes (Fisher *et al.*, 2012 ; Yekkour, 2013 ; Toumatia, 2015). Par ailleurs, outre ces répercussions sur le rendement, certains champignons produisent une variété de mycotoxines susceptible de contaminer les denrées alimentaires et les aliments pour animaux ce qui peut avoir des répercussions sur la santé humaine et animale (Demeke *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005). En revanche chez l'Homme *Candida albicans* est le pathogène fongique le plus commun (Sardi *et al.*, 2013). Il est responsable de diverses candidoses orales et vaginites et d'infections systémiques chez les patients immunodéficients et recevant une antibiothérapie à large spectre (Kettani *et al.*, 2006; Segal, 2005).

Plusieurs méthodes de lutte ont été envisagées pour combattre les maladies fongiques des plantes en particulier par l'utilisation des actinobactéries. Certaines espèces du genre *Streptomyces*, bien connues pour leur pouvoir de production d'antibiotiques, ont été intensivement étudiées en tant qu'agents de contrôle biologique contre les champignons phytopathogènes comme *Fusarium oxysporum*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* (El-Shanshoury, 1996; Minuto *et al.*, 2006; Errakhi *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Cela a permis d'aboutir à des formulations commercialisées contre les pourritures et les fontes des semis causées par des champignons telluriques tels que *F. culmorum* (Lahdenperä *et al.*, 1991 ; Doumbou *et al.*, 2001).

La demande de nouveaux antibiotiques antifongiques continue de croître en raison de la propagation rapide des pathogènes qui causent des infections graves voir mortelles. En plus, les antifongiques qui sont disponibles à l'heure actuelle en thérapeutique ne réunissent pas les critères définissant l'antibiotique idéal citant la toxicité spécifique vis-à-vis du champignon pathogène et l'absence d'effets secondaires (Nafis *et al.*, 2016). Bien que des progrès considérables ont été réalisés dans les domaines de la synthèse chimique et de la biosynthèse modifiée des composés antifongiques (Bredholt *et al.*, 2008), la nature demeure la source la plus riche et la plus polyvalente des antibiotiques antifongiques (Se-Kwon, 2015).

Les actinobactéries sont les principaux producteurs de métabolites secondaires bioactifs y compris les antibiotiques antifongiques (Qinet *al.*, 2016) qui jouent le rôle d'agents de contrôle de plusieurs pathologies (Giddingset Newman, 2014 ; Yekkour, 2013 ; Toumatia, 2015). Celanous a incité à isoler quelques souches d'actinobactéries à partir de deux sols provenant de deux régions en Algérie, de les caractériser partiellement et d'évaluer leur action antagoniste contre divers champignons pathogènes et/ou toxigènes.

Ce travail est présenté en trois parties :

- ❖ La première partie est réservée à une analyse bibliographique portant sur les différents aspects abordés dans ce mémoire, à savoir, la présentation des actinobactéries du point de vue taxonomique, propriétés et intérêt,
- ❖ La deuxième partie est consacrée à la description du matériel et des méthodes utilisées.
- ❖ Dans la troisième partie, les résultats sont présentés et discutés. Ils concernent tout d'abord l'isolement des actinobactéries, la purification et la conservation des isolats sélectionnés et leur identification partielle, et enfin l'évaluation de leur activité antifongique.

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

1. Définition des actinobactéries

Les actinobactéries, appelées auparavant actinomycètes (Perry *et al.*, 2004), sont des bactéries à Gram-positif dont la plupart sont mycéliennes, et ayant toutes un taux de guanine + cytosine supérieur à 55 %; elles forment en outre un groupe homogène sur la base des données de la biologie moléculaire (séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S) (manuel de Bergey, 2012).

Étymologiquement, le mot « actinomycète » est dérivé des mots grecs «Aktis» qui veut dire rayon et « mykes» qui veut dire champignon, et ce, en raison de la formation de colonies mycéliennes rayonnantes (Subramaniam *et al.*, 2016).

La croissance des actinobactéries donne lieu à des colonies circulaires (Colombié, 2005). La majorité des actinobactéries ne sont pas mobiles, et quand la mobilité est présente, elle est limitée en général à la production de spores flagellées (Makhijani, 2008). La plupart des actinobactéries sont des saprophytes capables d'utiliser une grande variété de sources nutritionnelles, y compris divers polysaccharides complexes (chitine, kératine, cellulose, lignine, etc.). Elles sont principalement neutrophiles et mésophiles (pH optimal entre 7,0 et 7,5 et une température entre 28 et 30 °C) (Ait Barka *et al.*, 2016).

Les actinobactéries sont classées dans le Domaine des *Bacteria*, le Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria* et la Sous-Classe des *Actinobacteridae* (Euzéby, 2015). Le phylum des *Actinobacteria* contient 6 classes, 21 ordres, 53 familles et 221 genres (Manuel de Bergey, 2012), alors qu'il contenait en 2004 une seule classe (*Actinobacteria*) et un seul ordre (*Actinomycetales*) (Manuel de Bergey, 2004). Les genres sont caractérisés par une diversité morphologique importante, allant du simple cocci (ex.: *Micrococcus*) à des formes mycéliennes qui peuvent être fragmentées (ex.: *Nocardia*) ou non (ex.: *Streptomyces*). Les genres d'actinobactéries les plus courants sont *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* (El-Tarabily et Sivasithamparam., 2006).

Ainsi, la position taxonomique des actinobactéries, en prenant comme exemple l'espèce *Actinopolyspora algeriensis* décrite par Meklat *et al.* (2012), s'établit comme suit :

Phylum : *Actinobacteria*

Classe : *Actinobacteria*

Ordre : *Pseudonocardiales*

Sous-Ordre : *Actinopolysporineae*

Famille : *Actinopolysporaceae*

Genre : *Actinopolyspora*

Espèce : *Actinopolyspora algeriensis*

2. Ecologie des actinobactéries

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires présents dans une grande variété d'habitats en raison de leur grande capacité adaptative. On les retrouve dans le sol, l'air, les eaux douces, les eaux de mer, les composts, les débris végétaux, le pollen, les abeilles mellifères, les plantes (endophytes), les lichens et plusieurs autres substrats, avec une préférence très nette pour le sol (Goodfellow et Williams 1983; González *et al.*, 2005 ; Khamna *et al.*, 2009; Kuang *et al.*, 2015, Shivlata et Satyanarayana, 2015).

Ces bactéries ont également la faculté de coloniser d'autres biotopes particuliers tels que les déserts chauds, les glaciers, les sites pollués par des hydrocarbures ou par des métaux lourds, les grottes naturelles, les lacs extrêmement alcalins, certains milieux très salés ou encore les sédiments marins profonds (Sabaou *et al.*, 1998; Genilloud *et al.*, 2011; Mohammadipanah et Wink, 2016). La plupart des actinobactéries sont saprophytes, mais certaines d'entre elles sont pathogènes ou encore symbiotiques des plantes ou des animaux (Williams *et al.*, 1984; Locci, 1994; Peltola *et al.*, 2001).

3. Répartition des actinobactéries dans le sol

Le sol représente le réservoir le plus important en actinobactéries mycéliennes (10 à 20% de la microflore tellurique) (Goodfellow et Williams, 1983; Theilleux, 1994). L'abondance des actinobactéries mycéliennes au niveau du sol est influencée par plusieurs facteurs physico-chimiques tels que la nature et la richesse en matières organiques, la température, le pH, la profondeur, l'aération et l'humidité. Leur répartition verticale va de la surface à plus de 2 mètres de profondeur avec un optimum entre 2 et 15 cm (Breton *et al.*, 1989 ; Sabaou *et al.*, 1992; 1998). Ce sont généralement des bactéries aérobies strictes, à l'exception de certaines espèces qui sont anaérobies facultatives (*Oerskovia*) microaérophiles ou anaérobies strictes (*Actinomyces* et *Agromyces*) (Lechevalier, 1972). Les actinobactéries préfèrent une humidité réduite de l'ordre de 5 à 25%. A l'instar des autres bactéries du sol, la majorité des actinobactéries est mésophile et

neutrophile. Certaines espèces sont acidophiles ou basophiles et d'autres sont thermophiles ou encore halophiles (Hagedorn, 1976 ; Meklat *et al.*, 2011; Meklat *et al.*, 2012b).

4. Critères d'identification des actinobactéries

La définition des genres et des espèces se base sur un ensemble de caractères morphologiques, physiologiques, chimiotaxonomiques et génomiques (Manuel de Bergey, 2012).

4.1. Critères morphologiques

Les critères morphologiques sont énoncés dans les manuels de Bergey et consistent en une caractérisation macromorphologique et micromorphologique (Manuels de Bergey de 1989, 1994, 2004 et 2012).

4.1.1. Caractéristiques macromorphologiques

Les caractères culturels contribuent parfois à différencier les groupes d'actinobactéries entre eux. Ces caractères sont basés sur:

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

4.1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les critères micromorphologiques importants sont :

- La fragmentation ou non du MS.
- La présence de sporanges sur le MA (*Streptosporangium*, *Spirillospora*, etc.) ou sur le MS (*Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, etc.), la forme et la taille des sporanges et la longueur des sporangiophores.
- La formation de spores sur le MA et/ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement: spores isolées (*Micromonospora* sur le MS, *Saccharomonospora* sur le MA), par deux (*Microbispora*), par quatre (*Microtetraspora*) ou en chaînes courtes et denses (*Actinomadura*) ou longues et aérées (*Streptomyces*).
- Le mode de sporulation : spores portées par des sporophores (*Streptomyces*, *Actinomadura*, etc.) ou mycélium aérien se fragmentant de manière anarchique en de longues chaînes de spores (*Nocardiosis*, *Saccharothrix*, etc.).

- La présence de spores mobiles (*Spirillospora* sur le MA, *Actinoplanes* sur le MS, etc.) ou non mobiles (la majorité des actinobactéries : ex. *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, etc.).

- L'ornementation de la surface des spores (lisses, rugueuses, épineuses ou chevelues).

- La formation de structures particulières : synnemata (*Actinosynnema*), faux sporanges (*Kibdelosporangium*), etc.

La micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries mycéliennes et quelques exemples sont donnés dans la figure 1.

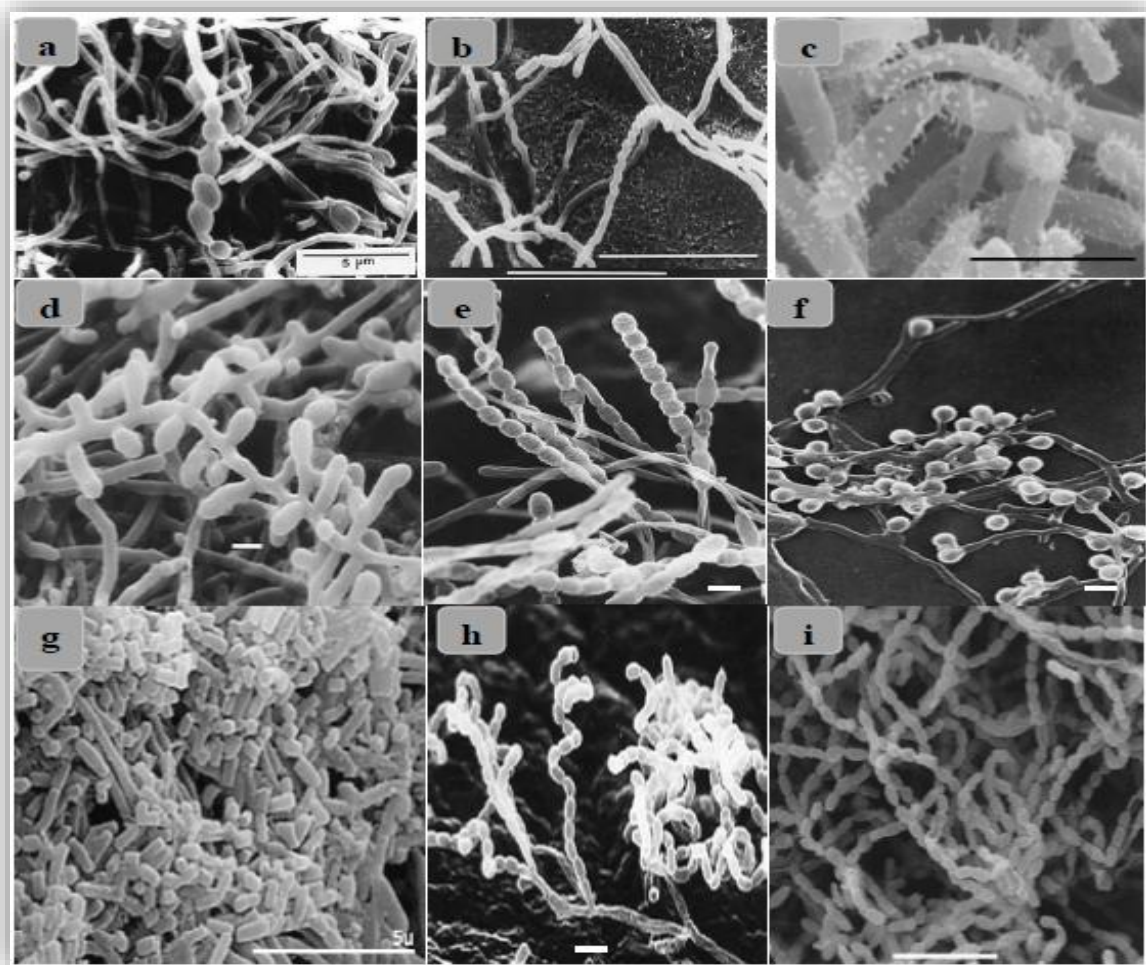


Figure 1. Micromorphologie de quelques espèces d'actinobactéries appartenant à différents genres.

Les observations ont été effectuées au microscope électronique à balayage. a. *Saccharopolyspora interjecta* (Miyadoh *et al.*, 2002). b. *Nocardiopsis lucentensis* (Yassin *et al.*, 1993). c. *Pseudonocardia spinosa* (Miyadoh *et al.*, 2002). d.

Saccharomonospora viridis (Miyadoh *et al.*, 2002). e. *Microtetraspora roseola* (Miyadoh *et al.*, 2002). f.

Micromonospora sp. (Miyadoh *et al.*, 2002). g. *Glycomyces rutgersensis* (Miyadoh *et al.*, 2002). h. *Streptomyces* sp.

SF2587 (Miyadoh *et al.*, 2002). i. *Actinoalloteichus cyanogriseus* (Tamura *et al.*, 2000).

4.2. Critères chimiques : chimiotaonomie

Les critères chimiques consistent en la détermination de la composition cellulaire en acides aminés pariétaux, en glucides totaux, en phospholipides, en ménaquinones et en acides gras membranaires (Manuel de Bergey, 2012)(Tableau 1).

Tableau 1. Principaux critères utilisés pour la chimiotaxonomie des actinobactéries.

Type de composé	Structure cellulaire	Composés taxonomiquement importantes							Chimiotype	Exemple
		LL-DAP	DL-DAP	Gly	Orn	DAB	Lys			
Acides aminés	Paroi cellulaire									
Sucres	Cellule entière	Arabinose + xylose	-	+	+	-	-	-	II D	<i>Micromonospora</i>
		Madurose (= 3-0-méthyle galactose)	-	+	-	-	-	-	III B	<i>Actinomadura</i>
		Rhamnose + galactose	-	+	-	-			III E	<i>Saccharothrix</i>
		Arabinose + galactose	-	+	-	-	-	-	IV A	<i>Nocardia</i>
		Absence de sucres taxonomiquement importants cités ci-dessus.	+	-	+	-	-	-	I C	<i>Streptomyces</i>
			-	+	-	-	-	-	III C	<i>Nocardiopsis</i>
			-	-	-	+	-	+	V	<i>Actinomyces</i>
			-	-	-	-	-	+	VI	<i>Oerskovia</i>
-	-		+		+	+/-	VII	<i>Agromyces</i>		
-	-	-	+	-	-	VIII	<i>Cellulomonas</i>			

Synthèse bibliographique

Suite du tableau 1.

Type de composé	Type de lipide	Structure cellulaire	Composés taxonomiquement importantes				Chimiotype	Exemples
			PE	PC	PG	PGI		
Lipides	Phospholipides	Membrane cellulaire	-	-	-	V	PI	<i>Actinomadura, Spirillospora</i>
			+	-	-	-	PII	<i>Streptomyces, Pseudonocardia, Saccharothrix</i>
			-	+	-	V	PIII	<i>Amycolatopsis, Nocardiosis,</i>
			+	-	+	-	PIV	<i>Nonomuraea, Saccharopolyspora</i>
			-	-	+	+	PV	<i>Oerskovia</i>
	Acides gras (Ag)		Ag saturés, Ag insaturés, iso 14/16/18 C, iso 15/17 C ; anteiso 15/17 carbones 10-méthyl cyclopropane (17/18 C)					
Ménaquinones (MK)	MK-7, MK-8(H ₂), MK-8(H ₄), MK-9, MK-9(H ₂), MK-9(H ₄), 9(H ₆), MK-9(H ₈) MK-10-MK-10(H ₄), MK-10(H ₆)							

Note : PE : phosphatidyléthanamine; PC: phosphatidylcholine; PG: phospholipides contenant de la glucosamine; PGI: phosphatidylglycérol. + : présent; - : absent; v : variable selon les genres et les espèces; orn: ornithine ; Gly: glycine; Lys: lysine; DAP : acide diaminopimélique; DAB: acide diaminobutyrique.

4.3. Critères physiologiques

Les tests physiologiques sont utilisés pour la détermination des espèces d'actinobactéries. Ils consistent en :

- des tests de dégradation de différents composés (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.),
- des tests de résistance à différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents),
- des tests de croissance à différents pH, température, concentrations en NaCl, etc.

4.4. Critères moléculaires

Les principales analyses moléculaires utilisées en taxonomie des actinobactéries sont le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, l'hybridation ADN-ADN et la détermination du pourcentage de guanine-cytosine de l'ADN génomique.

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

L'ARNr 16S est un outil rapide et fiable pour la classification phylogénétique et l'identification des bactéries (Stackebrandt et Schumann, 2006). Lorsque le taux de similarité entre les séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S de deux souches est inférieur à 98,65%, ces souches appartiennent à deux espèces différentes. Par contre, si le pourcentage de similarité est égal ou supérieur à 98,65%, le placement de deux souches dans une même espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats de l'hybridations ADN-ADN (Kim *et al.*, 2014).

4.4.2. Hybridation ADN-ADN

L'identification définitive des espèces se fait par hybridation ADN-ADN qui consiste à déterminer le pourcentage de réassociation de l'ADN génomique d'un taxon avec celui des espèces les plus proches. Si le taux de ressemblance de l'ADN génomique est inférieur à 70% les deux espèces sont considérées comme étant différentes (Wayne *et al.*, 1987).

4.4.3. Pourcentage en guanine-cytosine

L'introduction du pourcentage de guanine-cytosine dans la taxonomie revient à Chargaff (1950) qui a montré que le contenu en base puriques et pyrimidiques de l'ADN peut varier entre 25 et 75% chez les bactéries. Les bactéries dont le taux en G+C diffère de plus de 5% ne peuvent pas appartenir à une même espèce et les bactéries dont le taux en G+C diffère de plus de 10% ne peuvent pas 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).

5. Description morphologique de quelques genres d'actinobactéries

Notre travail étant basé en partie sur la description morphologique de plusieurs isolats d'actinobactéries, nous avons jugé utile de donner quelques informations sur la morphologie des principaux genres décrits dans la littérature ou de certains genres, même rares de par le monde mais que l'on a obtenus dans notre cas.

5.1. Le genre *Streptomyces*

Dans l'édition du manuel de Bergey de 2004 et dans les éditions plus anciennes, le genre *Streptomyces* a été classé dans l'ordre des *Actinomycetales*. Cependant, plus récemment, Goodfellow *et al.* (2012) ont scindé, sur la base des données de la biologie moléculaire, l'ordre des *Actinomycetales* en plusieurs ordres. Le genre *Streptomyces* appartient actuellement à l'Ordre des *Streptomycetales* et à la Famille des *Streptomycetaceae* (Manuel de Bergey, 2012).

Morphologiquement, et selon Goodfellow *et al.* (2012), les espèces appartenant au genre *Streptomyces* possèdent un mycélium du substrat abondamment ramifié et non fragmenté, surmonté par un mycélium aérien produisant des sporophores qui donnent naissance à des chaînes de spores (généralement de 10 à 50 spores par chaîne ou parfois plus). Les chaînes sont de forme variée : droites à flexueuses (*Rectus Flexibilis* : type RF), en crochets ou en boucles (*Retinaculum Apertum* : type RA), spirales (*Spira* : type S) ou parfois même verticillées (Figure 2). Des formes intermédiaires (SRA, SRF, RARF) sont parfois observées. Les spores ne sont pas mobiles et ont une surface lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue (la surface étant observée au microscope électronique à balayage). Selon la couleur du mycélium aérien (MA), les espèces de *Streptomyces* sont classées dans sept séries: rouge (MA rose, rose jaunâtre, rose brunâtre), jaune (jaunâtre, beige, jaune-verdâtre, jaune grisâtre), vert (verdâtre, vert grisâtre, vert bleuté), bleu (bleu, bleu grisâtre, bleu verdâtre), gris (gris clair, moyen ou foncé, gris verdâtre, gris bleuté), violet ou blanc. Le genre *Streptomyces* est celui qui comporte le plus grand nombre d'espèces. En effet, il comptait en 2012 plus de 612 espèces définies sur la base du gène codant pour l'ARN 16S et de l'hybridation ADN-ADN (Labeda *et al.*, 2012).



Figure 2. Morphologie des chaînes de spores des espèces de *Streptomyces* (Hütter, 1967).
 1: droites à flexueuses (type RF); 2: en crochets ou en boucles (type RA); 3: spires serrées, 4: spires ouvertes, 5: chaînes droites verticillées, 6: chaînes spiralées verticillées.

5.2. Le genre *Actinomadura*

Le genre *Actinomadura* est rattaché à la famille des *Thermomonosporaceae*, et à l'ordre des *Streptosporangiales* (Puhl *et al.*, 2009; Whitman *et al.*, 2012). Les espèces du genre *Actinomadura* sont isolées de divers sols (désertiques, cultivables et de montagnes), le sol représente leur premier réservoir (Yassin *et al.*, 2010; Badji *et al.*, 2011; Bonnet *et al.*, 2011; Lee, 2012). Elles ont un mycélium aérien qui peut être blanc, jaune, jaune grisâtre, rose pâle, rose jaunâtre, vert bleuâtre ou gris, sur lequel se forme des chaînes de spores courtes (en général de 2 à 8 spores par chaîne seulement, plus rarement jusqu'à 15) portées par de très courts sporophores; ceci les distingue des espèces de *Streptomyces* à chaînes de spores longues et portées par des sporophores bien développés. Les chaînes peuvent être droites, incurvées (sous forme de crochet ou de boucle), ou spiralées (spires à un à deux tours) (Figure 3). Le mycélium du substrat peut être non coloré, jaune pâle à jaune vif, orange, rouge, gris, brun, vert ou bleu. Il est bien développé et non fragmenté. Le genre *Actinomadura* comprend 75 espèces et deux sous espèces décrites et dont les noms sont validés (Euzéby, 2012).

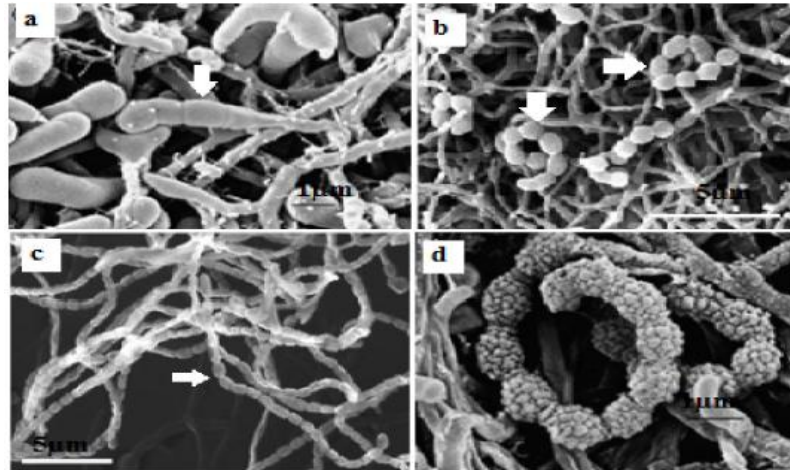


Figure 3. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage du mycélium aérien de quelques espèces d'*Actinomadura*.

a: courte chaîne de 3 spores de *A. catellatispora* 80-60^T (Lu *et al.*, 2003), b: spires avec 7-8 spores de *A. chokoriensis* 3-45-a(11)^T (Ara *et al.*, 2008), c: chaîne droite d'environ 15 spores de *A. flavalba* YIM 61435^T (Qin *et al.*, 2009 b), d: chaîne incurvée de 10 spores avec paroi verruqueuse de *A. glauciflava* 3.24T (Lu *et al.*, 2003).

5.3. Le genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* a été décrit par Labeda *et al.* en 1984. Il est actuellement classé dans l'ordre des *Pseudonocardiales* et dans la famille des *Pseudonocardiaceae* (Manuel de Bergey, 2012). Les colonies sont de couleur diversifiées (MS jaune clair, orange, brun, brun-rouge et bleu) et le MA peut être blanc, jaune clair à orangé, rose ou bleu. Le MA est ramifié et se fragmente totalement de manière anarchique, souvent en zig-zag, en de longues chaînes de spores ovoïdes ou en bâtonnets, bien différenciées et non mobiles (Figure 4). Le mycélium du substrat (MS) se fragmente en zig-zag donnant des éléments coccoïdes ou en bâtonnets non mobiles (Labeda et Kroppenstedt, 2000). Le genre *Saccharothrix* compte actuellement 17 espèces dont 6 ont été décrites par des chercheurs du LBSM, à savoir *Sa. algeriensis* (Zitouni *et al.*, 2004), *Sa. hoggarensis*, *Sa. Saharensis*, *Sa. tamanrassetensis* (Boubetra *et al.*, 2013_{a,b}; 2014), *Sa. isguenensis* (Bouznada *et al.*, 2016) et *Sa. ghardaiensis* (Bouznada *et al.*, 2017).

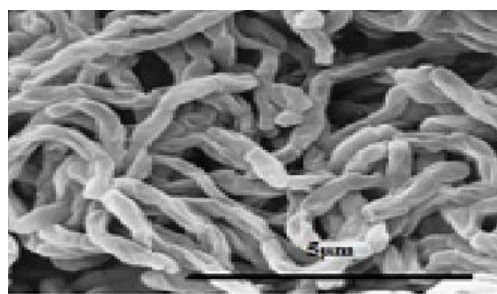


Figure 4. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de *Sa. algeriensis* SA 233^T (Zitouni *et al.*, 2004).

5.4. Le genre *Nocardiopsis*

Le genre *Nocardiopsis* est rattaché à la famille des *Nocardiopsaceae* et à l'ordre des *Streptosporangiales* (Hozzein et Goodfellow, 2008; Whitman *et al.*, 2012). Ce genre est caractérisé par un mycélium du substrat en général de couleur jaune, beige ou brun clair à foncé et un mycélium aérien très fourni, de couleur blanche, beige à jaune grisâtre (Meyer, 1976 ; Rudramurthy *et al.*, 2012). Le mycélium du substrat se fragmente un peu. Le mycélium aérien se fragmente de manière anarchique en donnant des chaînes de spores très longues, très irrégulières et en zig-zag, avec souvent des espaces entre les chaînes contrairement au genre *Saccharothrix* (Figure 5) (Meyer, 1976; Yassin *et al.*, 1997; Hozzein et Goodfellow, 2008; Yassin *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011). Ce taxon contient 44 espèces et 5 sous espèces (Euzéby, 2012). *Nocardiopsis dassonvillei* est l'espèce type de ce genre (Meyer, 1976 ; Euzéby, 2012).

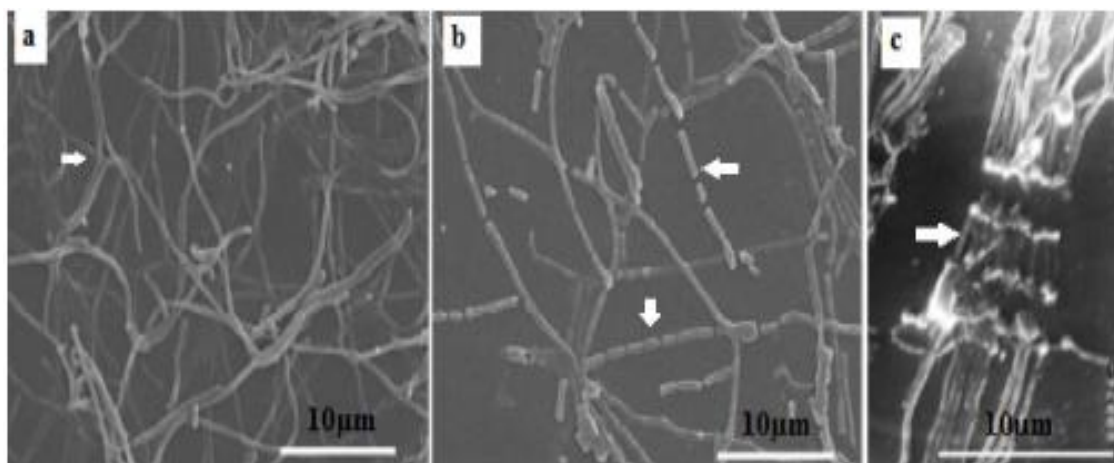


Figure 5. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage du mycélium de l'espèce *Nocardiopsis valliformis* HBUM 20028^T (Yang *et al.*, 2008).

a: Mycélium du substrat ramifié, b et c: mycélium aérien qui se divise en chaînes de spores.

5.5. Le genre *Nocardia*

La première espèce classée dans le genre *Nocardia*, nommée *Nocardia farcinica*, a été isolée par le vétérinaire Edmond Nocard en 1889. Elle est responsable de la maladie du farcin du bœuf, (Orth et Guénet, 2003). Les espèces du genre *Nocardia* sont classées dans la famille des *Nocardiaceae*, dans l'ordre des *Corynebacteriales* (Brown-Elliott *et al.*, 2006; Whitman *et al.*, 2012).

Les colonies des espèces de *Nocardia* sont généralement de couleur blanche, beige, jaune à orange (mycélium du substrat) et sont surmontées par un mycélium aérien, le plus souvent de couleur blanche, qui se développe à ras de la colonie. Le mycélium du substrat se fragmente de manière excessive, en zig-zag, aboutissant à la formation d'éléments en bâtonnets et/ou coccoïdes

non mobiles. Le mycélium aérium est constitué de filaments généralement courts, stériles ou se fragmentant plus ou moins en zig-zag (Figure 6) (Yassin et Brenner, 2005 ; Couraud *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2009). Le genre *Nocardia* est rapproché à d'autres genres d'actinobactéries, dites nocardioformes, en raison de leurs caractéristiques morphologiques (mycélium du substrat et mycélium aérien se fragmentant en éléments bacillaires et coccoïdes) (Cargill *et al.*, 2010). Ce genre contenait 75 espèces en 2012 (Manuel de Bergey, 2012).

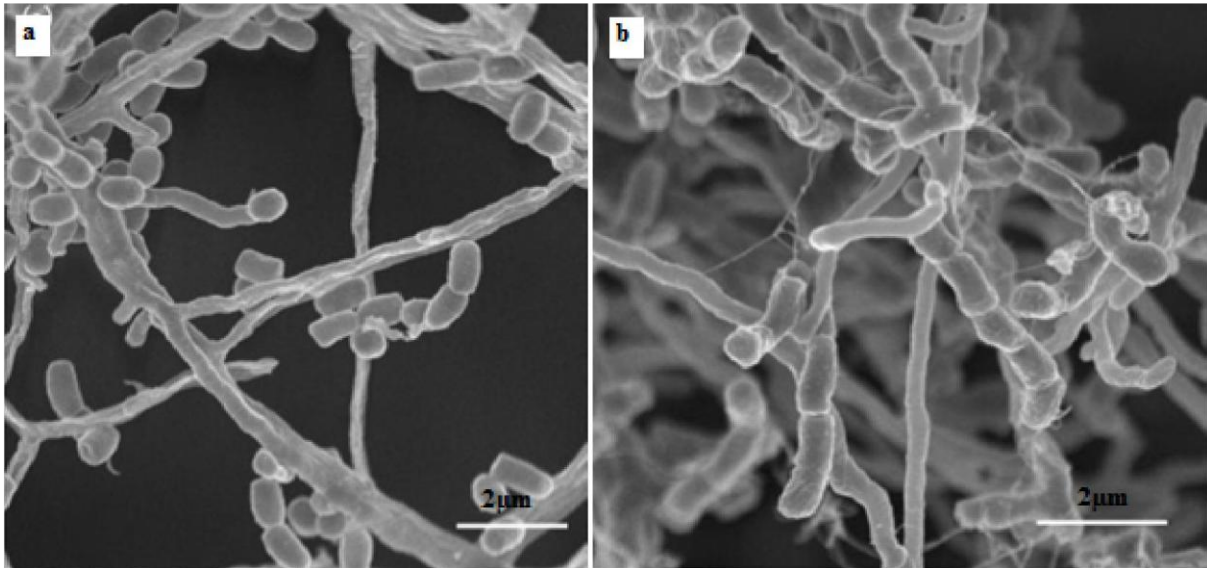


Figure 6. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de deux espèces du genre *Nocardia* (Kageyama *et al.*, 2004).

a: *N. araoensis* IFM 0575^T; b: *N. pneumoniae* IFM0784^T.

5.6. Le genre *Amycolatopsis*

En 1986, Lechevalier *et al.* ont proposé la création du genre *Amycolatopsis* (Amoroso *et al.*, 2013). Les membres de ce genre forment un mycélium du substrat ramifié qui se fragmente en partie (moins que les *Nocardia*) en zig-zag formant des éléments en bâtonnets ou coccoïdes. Le mycélium aérien est très bien développé; les filaments sont très longs (contrairement à *Nocardia*) et se fragmentent en de longues chaînes plus ou moins régulières d'éléments bacillaires ou coccoïdes (Manuel de Bergey, 2012) (Figure 7). Ce genre contient 47 espèces (Amoroso *et al.*, 2013).

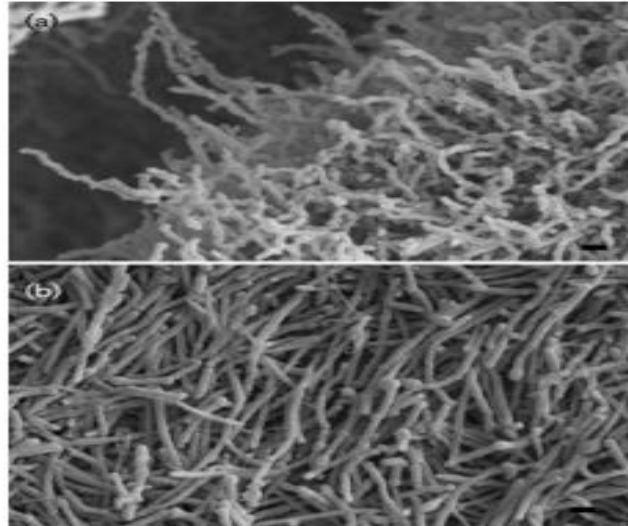


Figure 7. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de la souche NRRL B-16697^T d'*Actinocolatopsis fastidiosa*.

(a): fragmentation du mycélium aérien; (b): fragmentation du mycélium du substrat.

5.7. Le genre *Actinoplanes*

Le genre *Actinoplanes* a été proposé par Couch (1950). Les membres du genre se caractérisent par la production du mycélium de substrat et l'absence du mycélium aérien (Manuel de Bergey, 2012). Les espèces de ce genre possèdent des sporanges globuleux sphériques à irréguliers portés par de très courts sporangiophores. Les spores (sporangiospores) sont mobiles grâce à des flagelles polaires ou péritriches (Figure 8) (Palleroni, 1979; Wink *et al.*, 2006). Ce genre contient 37 espèces (Nurkanto *et al.*, 2015).

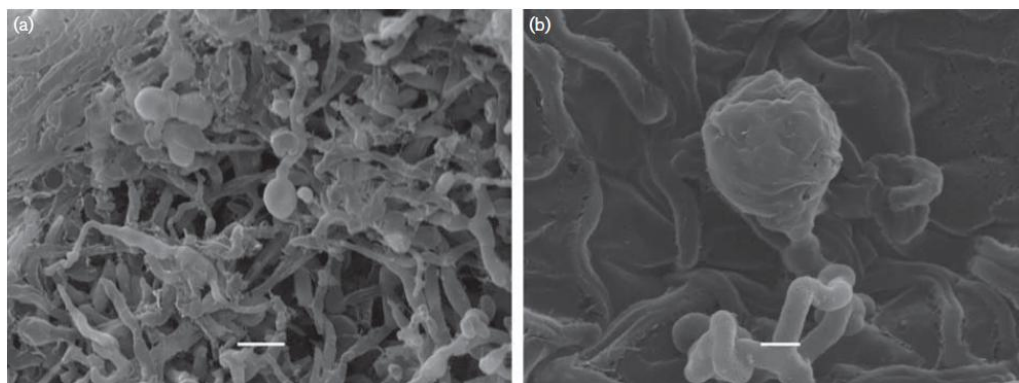


Figure 8. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage des sporanges sur le mycélium du substrat de deux espèces du genre *Actinoplanes* (Nurkanto *et al.*, 2015).

a: *Actinoplanes tropicalis*, b: *Actinoplanes cibodasensis*.

6. Isolement et sélection des genres d'actinobactéries mycéliennes

Les techniques sélectives employées pour isoler les actinobactéries mycéliennes y compris celles qui sont rares telles que *Saccharothrix*, *Actinomadura* et *Nocardia* sont basées sur l'utilisation d'un milieu à base de chitine par la présence de vitamines B ou encore l'emploi d'agents sélectifs tels que les antibiotiques à différentes concentrations (cyclosérine, érythromycine, gentamycine, kanamycine, novobiocine, oxytétracycline, pénicilline, polymyxine, rifampicine et streptomycine) (Sabaou *et al.*, 1998). En outre, en plus à l'actidione qui empêche la croissance des champignons, l'addition du lysozyme dans le milieu d'isolement a favorisé la sélection des *Saccharothrix*. L'utilisation de cet agent antibactérien est justifiée par le fait que ce genre en est beaucoup plus résistant par rapport aux autres groupes d'actinobactéries. La résistance des *Saccharothrix* vis-à-vis du lysozyme est liée à son appartenance à la famille des *Pseudonocardiaceae*, connue pour sa résistance à cet agent sélectif (Manuel de Bergey, 2012). De ce fait, l'utilisation de cet agent a également abouti à l'obtention de plusieurs souches de *Saccharothrix* dans le laboratoire de LBSM, y compris celles identifiées en tant que nouvelles espèces (Aouiche *et al.*, 2012; Boubetra *et al.*, 2013a,b,c).

7. Importance des actinobactéries mycéliennes

Les actinobactéries mycéliennes jouent un rôle important dans le sol et dans les interactions avec les plantes (Conn, 2005). Ils possèdent une importance économique majeure en raison de la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt biotechnologique ayant des applications dans divers domaines industriels, et en particulier pharmaceutiques (Ait Barka *et al.*, 2016).

7.1. Importance des actinobactéries dans les domaines pharmaceutiques et industriels

Les actinobactéries mycéliennes ont un rôle très important dans le secteur pharmaceutique. De nombreux isolats produisent des substances intéressantes, telles que les antibiotiques, les vitamines, des substances antioxydantes, anti-histaminiques, vasodilatatrices ou immunostimulantes et des enzymes utilisées dans les industries (Chang *et al.*, 2011; Karthik *et al.*, 2013; Ait Barka *et al.*, 2016; Axenov-Gribanov *et al.*, 2016; Mohammadipanah et Wink, 2016). Parmi ces substances, les antibiotiques sont ceux qui ont suscité le plus grand intérêt. Un nombre appréciable de composés antibactériens, antifongiques et anticancéreux, a trouvé une application dans la thérapeutique. Parmi les antibiotiques sécrétés par les actinobactéries mycéliennes, environ 75% (soit, plus de 7600 molécules) sont produits par les espèces du genre *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Berdy, 2005 ; Solecka *et al.*, 2012).

Plus de 50 taxons rares d'actinobactéries sont rapportés comme étant producteurs de 2500 composés bioactifs, soit plus de 25% du total des métabolites produits par les actinobactéries (Kurtböke, 2012 ; Subramani et Aalbersberg, 2013). Les genres peu fréquents à rares comme *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Nocardiopsis*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Microbispora*, *Planomonospora*, *Salinispora*, *Marinispora* et *Verrucosispora*, méritent un grand intérêt (Subramani et Aalbersberg, 2013).

7.2. Importance des actinobactéries dans le domaine agronomique

Les actinobactéries exercent de nombreuses activités dans le sol, y compris dans la dégradation de la matière organique (Kokar, 2008). Grâce à leurs propriétés antagonistes, les actinobactéries sont également utilisées dans la lutte biologique contre les maladies des plantes (El-Tarabily *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2009; Khamna *et al.*, 2010). Plusieurs études ont utilisé ces microorganismes comme agents potentiels de biocontrôle contre les champignons phytopathogènes (Berg *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2002; El-Tarabily *et al.*, 2010; Pithakkit *et al.*, 2015). (Tableau 2).

Tableau 2. Biocontrôle de certaines maladies fongiques par les actinobactéries mycéliennes autres que *Streptomyces* (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

Agent antagoniste	Agent pathogène	Plante	Maladie
<i>Actinoplanes</i> sp.	<i>Pythium ultimum</i>	Betterave	Fonte des semis
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>Glycinea</i>	Soja	Pourridié
<i>Streptosporangium albidum</i>	<i>Phytophthora coloratum</i>	Carotte	Cavité pythienne
<i>Streptoverticillium netropsis</i>	<i>Phytophthora coloratum</i>	Carotte	Cavité pythienne

8. Les antibiotiques

Un antibiotique est un composé chimique élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé, et dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des micro-organismes (Cohen et Jaquot, 2008).

Actuellement, les actinobactéries mycéliennes constituent la source majeure des antibiotiques (Hamaki *et al.*, 2005). De nombreuses études se sont récemment développées en vue de trouver de nouveaux antibiotiques produits par des actinobactéries appelées « rares » ou peu

fréquentes, mais qui sont en fait les actinobactéries autres que le genre *Streptomyces*, largement prédominant dans la nature. Les actinobactéries mycéliennes autres que *Streptomyces* sont à l'origine d'environ 11% des antibiotiques d'origine microbienne. Parmi les molécules élaborées par les actinobactéries mycéliennes, seules 20% sont des antifongiques, les 80% restantes ont des activités biologiques diverses : antibactériennes (surtout), antivirales, antitumorales, antiprotozoaires, insecticides, etc. (Lazzarini *et al.*, 2001, Tiwari et Gupta, 2011).

8.1. Les antibiotiques antibactériens

Les composés antibactériens ont pour cible les bactéries et peuvent agir à différents niveaux (Pebret, 2003; Walsh, 2003):

Au niveau de la paroi en inhibant la synthèse du peptidoglycane (ex.: β -lactamines).

Endétruisant les membranes cellulaires, externe et cytoplasmique (ex.: polymyxines B et E).

En inhibant la synthèse de l'acide nucléique par action sur l'ADN (ex.: quinolones et fluoroquinolones) et par action sur la synthèse d'ARN (ex.: rifampicine).

En inhibant la synthèse protéique (ex.: macrolides, phénicoles et certains aminosides).

En modifiant le métabolisme par interférence avec des métabolites (ex.: sulfamides).

8.2. Les antibiotiques antifongiques

Les antibiotiques antifongiques sont des molécules bioactives utilisées contre les champignons filamenteux et les levures et dont plusieurs sont pathogènes ou toxigènes pour l'homme et pour les plantes. Comme notre travail concerne la recherche d'actinobactéries productrices de composés antifongiques, nous donnons un peu plus de détails sur ces molécules.

Contrairement aux antibiotiques antibactériens, la recherche de nouveaux composés antifongiques a progressé lentement (Gupte *et al.*, 2002). Les raisons sont dues au fait que les champignons soient eucaryotes, comme les cellules des mammifères et les agents qui inhibent la biosynthèse des protéines, de l'ARN ou de l'ADN d'un champignon sont également toxiques pour l'hôte (Georgopapadakou et Walsh, 1994).

8.2.1. Classification

La classification des antifongiques peut se faire selon divers critères : structure chimique, leur origine ou mode d'action, etc. (Serge, 2010).

8.2.1.1. Classification selon la structure chimique

Les antibiotiques antifongiques présentent une large diversité structurale (Odds *et al.*, 2003). Ils peuvent être des Allylamines (ex.: terbinafine), des analogues de bases azotées (ex.: flucytosine), des azolés (ex.: fluconazole), des Echinocandines (ex.: caspofungine), des macrolides polyéniques (ex.: amphotéricine B), des composés aromatiques (ex.: griséofulvine), etc. (Figure 9) (Anderson, 2005).

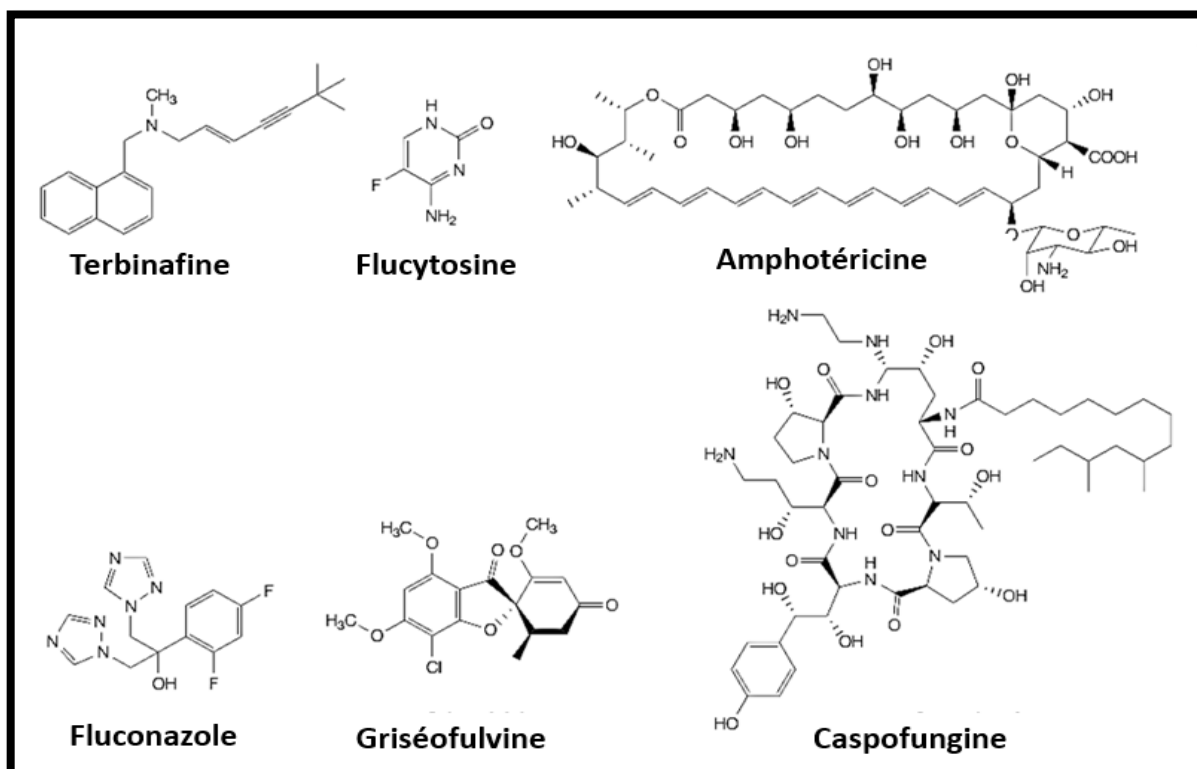


Figure 9. Structure chimique de certains antibiotiques antifongiques (Anderson, 2005).

8.2.1.2. Classification selon l'origine

Selon leur origine, les antifongiques peuvent être classés en « naturels » ou « de synthèse ».

A. Les antifongiques naturels

D'après Berdy *et al.* (1987), près de 40% des antibiotiques synthétisés par l'ensemble des microorganismes possèdent une activité antifongique. Ces molécules sont surtout synthétisées par des actinobactéries mycéliennes ou des champignons (Breton *et al.*, 1989). Les antifongiques naturels sont répartis en deux grands groupes : les antifongiques de structure polyénique et les antifongiques de structure non polyénique.

▪ **Les antifongiques polyéniques :**

les antifongiques polyéniques, appelés macrolides polyéniques ou encore polyènes, sont des lactones macrocycliques constituées d'un cycle lactone possédant une partie hydrophile (6 à 14 fonctions hydroxyles) et un "squelette" carboné hydrophobe comportant des doubles liaisons conjuguées pouvant être au nombre de trois à sept: 3 (triènes), 4 (tétraènes), 5 (pentaènes), 6 (hexaènes) ou 7 (heptaènes) (Dinya, 1986). Ces composés ont un spectre UV-visible caractéristique (tableau 3) avec 3 maxima d'absorption entre 260 et 405 nm (Martin, 1979). Ils ont un spectre d'action sur les champignons filamenteux et unicellulaires et sur certains protozoaires et algues. A part quelques rares exceptions, ils sont inactifs sur les bactéries et les virus. Vu leur instabilité, leur toxicité et les problèmes liés à leur absorption, très peu de molécules polyéniques sont utilisées en thérapie, parmi lesquelles l'amphotéricine B et la nystatine qui sont les plus importants (Tableau 3).

Tableau 3.Maxima d'absorption en UV-visible des macrolides polyéniques (Martin, 1979).

Types de polyènes	Longueur d'onde (nm)			Exemples
	Premier pic	Deuxième pic	Troisième pic	
Triènes	283	272	262 ±2	Triénine
Tétraènes	318	304	291 ±2	Nystatine
Pentaènes	350	331	317	Eurocidines
Méthylpentaènes	357	340	323	Filipine
Carbonylpentaènes	364	Bande d'absorption étendue		Mycoticine
Hexaènes	380	358	340 ±2	Candihexine
Carbonylhexaènes	385	Bande d'absorption étendue		Dermostatine
Heptaènes	405	382	361 ±2	Amphotéricine B

▪ **Les antifongiques non polyéniques :**

Ils possèdent des structures chimiques très variées. Exemples : les aminoglycosides (kasugamycine), les aromatiques (griséofulvine), les quinones (certaines anthracyclines), les hétérocycles azotés (blastidine S), les composés alicycliques (cycloheximide), etc. Leur spectre UV-visible est très variable mais ne présente, en aucun cas, les trois pics caractéristiques des polyènes (Berdy *et al.*, 1987). Ainsi, la griséofulvine (produite par *Penicillium griseofulvum*), la pradimicine et la bénanomycine (produites par quelques espèces d'*Actinomadura*) sont les seuls antifongiques non polyéniques d'origine naturelle utilisés en thérapie humaine (Dupont, 2007).

B. Les antifongiques de synthèse

Plusieurs molécules utilisées en thérapeutique humaine ou vétérinaire, ainsi qu'en agriculture, proviennent de la synthèse chimique, tels que les analogues des nucléosides (ex.: la flucytosine qui est un analogue de la pyrimidine), les allylamines (ex.: la terbinafine), les azolés (ex.: imidazoles, fluconazole), les échinocandines et les pneumocandines (ex.: caspofungine, micafungine), ou encore les carbamates et dérivés (ex.: thiocarbamates) (Brent, 1984; Koltin et Hitchcock, 1997; Groll *et al.*, 1998; Andriole, 2000; Dupont, 2007).

8.2.1.3. Classification selon le mécanisme d'action

Les substances antifongiques affectent le cycle de vie normal des champignons en causant des interférences métaboliques au niveau cellulaire, selon divers mécanismes (Ostrosky-Zeichner, 2010):

- Inhibition de la synthèse des glucanes de la paroi cellulaire, comme c'est le cas pour les échinocandines qui sont des lipopeptides ayant une activité fongicide *in vitro* et *in vivo* contre les espèces de *Candida* et d'*Aspergillus* (Ghannoum et Rice, 1999) (Figure 10a).
- Inhibition de la synthèse des protéines (ex.: sordarines) (Figure 10b).
- Inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol nécessaire à la formation de la membrane cellulaire (ex.: dérivés azolés) (Figure 10c).
- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ex : flucomycine) (Figure 10d).

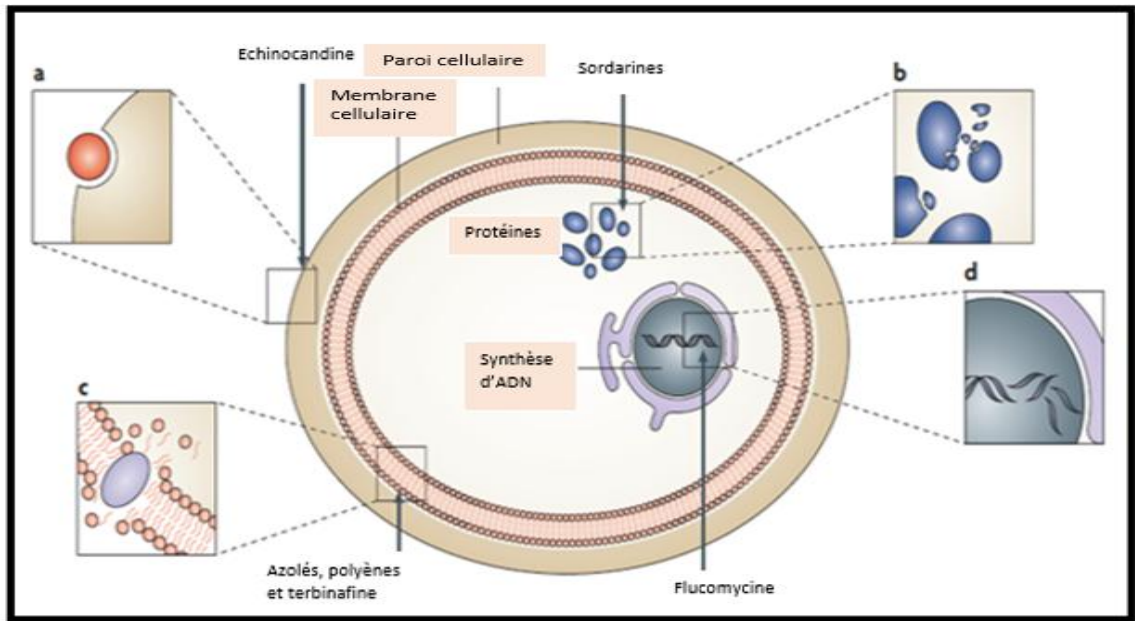


Figure 10. Mécanismes d'action de certains antifongiques (Ostrosky-Zeichner, 2010).

- Perturbation des fonctions de la membrane cellulaire (ex.:amphotéricine B). Ce processus peut causer des dommages supplémentaires tels que le dysfonctionnement des protéines membranaires et/ou la fragmentation des vacuoles en raison du changement du trafic de l'ergostérol. Différents modèles ont été proposés sur la base de l'interaction de l'amphotéricine B avec l'ergostérol, composant fongique de la membrane plasmique. La formation du canal ionique (pore) (Figure 11a) et l'adsorption superficielle (Figure 11b) entraînent des lésions de la membrane. Récemment, un nouveau mécanisme, le modèle éponge extra-membraneux de stérol, a été décrit (Figure 11c). L'amphotéricine B se lie à la surface de la membrane plasmique et extrait physiquement l'ergostérol, ce qui conduit à l'épuisement de ce constituant essentiel de la membrane et éventuellement à la rupture de la membrane (Lohner, 2014).

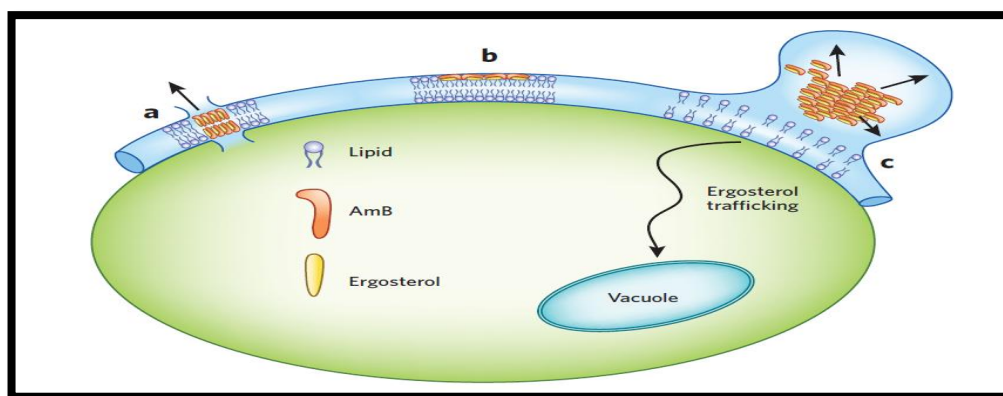


Figure 11. Mode d'action du composé antifongique, l'amphotéricine B (AmB) (Lohner, 2014).

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

Matériel

1. Sites d'études et prélèvement des échantillons de sols

L'isolement des actinobactéries est réalisé à partir de deux échantillons de sols provenant de Boumerdès et Mostaganem (Tableau 4 et Figure 12).

Tableau 4. Situation géographique des régions d'échantillonnage.

Région (code)	Altitude (mètres)	Latitude	Longitude
Mostaganem (Mg)	102	35°55'52" Nord	0°05'21" Est
Boumerdès (Bm)	2	36° 46' 0" Nord	3° 28' 0" Est



Figure 12. Carte d'Algérie montrant les régions d'échantillonnage des sols (<http://d-maps.com/index.php?lang=fr>).

Régions d'échantillonnage. Au centre, Boumerdes (Bm) ; à l'ouest, Mostaganem (Mg).

Matériel et méthodes

Les deux échantillons proviennent de deux parcelles de vignobles. Les ceps de vigne sont âgés de plus de quinze années. La collecte a eu lieu durant le mois de janvier 2017. Les prélèvements ont été effectués au voisinage des racines des ceps de vigne, à environ 20 cm de la surface. Les sols sont placés dans des sacs stériles scellés, puis conservés à 4°C (au maximum trois jours) jusqu'à leur utilisation pour l'isolement des actinobactéries. Cet échantillonnage a été effectué dans le cadre de doctorat.

2. Champignons-cibles

Les champignons-cibles ont été utilisés pour déterminer les activités antifongiques et le spectre d'action des actinobactéries isolées. Ils proviennent de la collection du LBSM, ENS de Kouba) (Tableau 6).

Tableau 5. Champignons-cibles utilisés.

Champignons-cibles	Pathogénicité/Toxicité	Référence
<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	Phytopathogènes : maladies du bois de vigne (Esca).	Zanzotto <i>et al.</i> (2001)
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>		Aroca <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Ochratoxinogène : sécrète l'ochratoxine A.	Romero <i>et al.</i> (2005)
<i>Fusarium culmorum</i>	Phytopathogène : fonte des semis, pourriture racinaire et fusariose de l'épichez les céréales. Toxinogène: sécrète la déoxynivalénol, la zéaralénone, etc.	Elyacoubi <i>et al.</i> (2012)
<i>Candida albicans</i>	Candidose (superficielle et profonde) chez l'homme.	Segal (2005)

Comme les échantillons de sols proviennent des vignobles, nous avons jugé intéressant de retenir comme champignons-cibles *Phaeoconiella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum* qui sont les champignons pionniers des maladies du bois de vigne. A ces deux champignons, nous avons ajouté *Fusarium culmorum* qui est phytopathogène et mycotoxinogène, *Aspergillus carbonarius* qui est mycotoxinogène, et *Candida albicans* qui est une levure pathogène pour l'homme.

3. Souches d'actinobactéries témoins

Les actinobactéries utilisées comme témoins proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'École Normale Supérieure (ENS) de Kouba (Tableau 5). L'activité antifongique de nos souches d'actinobactéries sera comparée à celle de ces souches témoins qui sont connues pour leur activité antifongique contre *F.culmorum* et *A.carbonarius*.

Tableau 6. Actinobactéries témoins

Actinobactérie témoin (code)	Référence
<i>Saccharothrix algeriensis</i> (Sa).	Zitouni <i>et al.</i> (2004).
<i>Streptomyces</i> sp. (AIA) phylogénétiquement proche de <i>Streptomyces mutabilis</i> .	Toumatia <i>et al.</i> (2014).
<i>Streptomyces</i> sp. (WAB) phylogénétiquement proche de <i>Streptomyces sambofaciens</i> .	Yekkour <i>et al.</i> (2015).

Méthodes

1. Isolement et purification des actinobactéries

1.1. Milieux d'isolement

L'isolement des actinobactéries est effectué sur le milieu chitine-vitamines agar (CH-V) et sur le milieu glycérol-asparagine-agar (GAA) (Annexe 1) préconisés par Hayakawa et Nonomura (1987) et Jiang *et al.* (2012) respectivement pour l'isolement des actinobactéries. Ces milieux sont supplémentés par des agents sélectifs (Tableau 7). Parmi les agents sélectifs additionnés on distingue un agent antifongique, l'actidione (50 mg/l) qui permet d'éviter les contaminations par les champignons présents dans les sols, des antibactériens tels que la polymyxine (25 mg/l), l'acide nalidixique (10 mg/l) et le lysozyme (100 et 500 mg/l) qui permettent de diminuer l'effectif microbien et d'orienter la sélection vers des isolats particuliers pouvant être intéressants. ils sont également utilisés pour l'isolement des genres rares (ex. *Saccharothrix* grâce au lysozyme) ou de souches ou espèces particulières de *Streptomyces* (Sabaouet *al.*, 1998; Kaewkla et Franco, 2010; Tseng *et al.*, 2010).

Tableau 7. Milieux d'isolement et agents sélectifs.

Milieux de culture	Agents sélectifs
Milieu 1 (CH-V)	Actidione (50 mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l).
Milieu 2 (CH-V)	Actidione (50 mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l) + lysozyme (100 mg/l).
Milieu 3 (CH-V)	Actidione (50 mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l) + polymyxine (25 mg/l).
Milieu 4 (GAA)	Actidione (50 mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l).
Milieu 5 (GAA)	Actidione (50 mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l) + lysozyme (100 mg/l).
Milieu 6 (GAA)	Actidione (50 mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l) + polymyxine (25 mg/l).
Milieu 7 (CH-V)	Actidione (50 mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l) + lysozyme (500 mg/l).

1.2. Ensemencement

La méthode d'ensemencement utilisée est celle des suspensions-dilutions (Rapilly, 1968) et étalement sur les milieux de culture coulés en boîtes de Pétri stériles. La dilution 10^{-1} est préparée par addition de 5 g de sol (prélevé d'une façon homogène à partir de l'échantillon de sol) dans 45 ml d'eau stérile. Trois autres suspensions (10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) sont préparées par dilution de 10 en 10, après homogénéisation de la dilution de départ par un mélange vigoureux à l'aide d'un vortex (Figure 13 a).

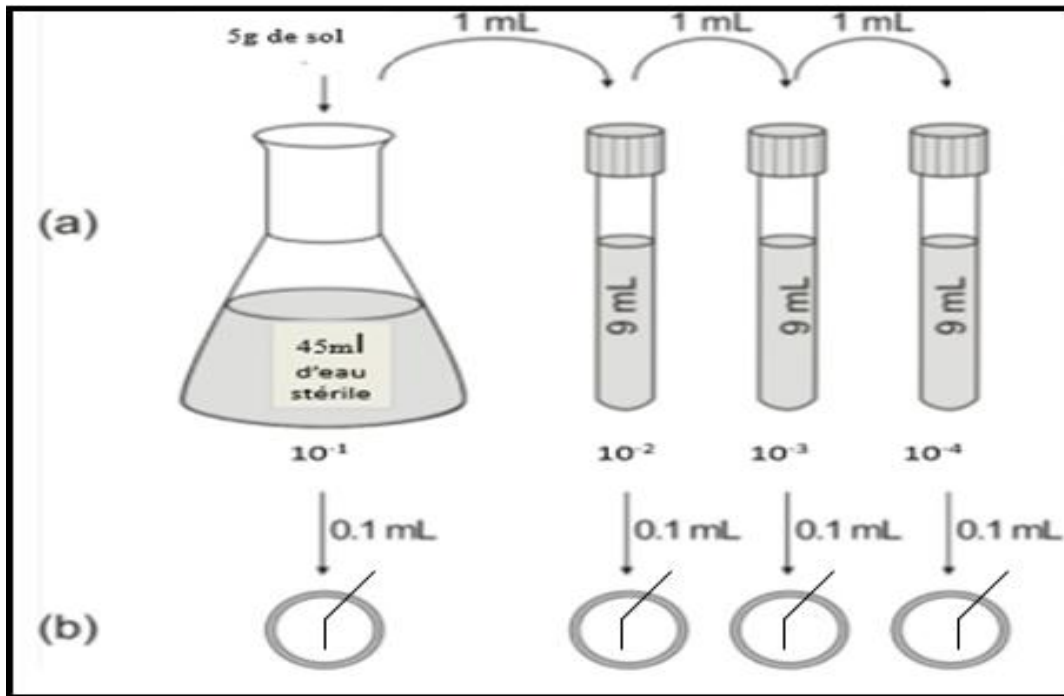


Figure 13. Technique de préparation des dilutions décimales et d'ensemencement.

Des aliquotes de 0,1 ml de chacune des dilutions sont ensemencées sur le milieu d'isolement par étalement à l'aide d'un râteau en verre stérile (Figure 13 b) à raison de deux répétitions par dilution pour chacun des milieux utilisés.

1.3. Incubation

Les boîtes ensemencées sont incubées à 30 °C et examinées régulièrement à partir du 7^{ème} jour jusqu'au 14^{ème} jour ou plus, en raison notamment de la croissance parfois assez lente qui caractérise certains genres d'actinobactéries (Rapilly, 1968).

1.4. Sélection, purification et conservation des isolats d'actinobactéries

Les colonies qui ont montré, après observation à l'œil nu et au microscope optique, les caractéristiques morphologiques des actinobactéries mycéliennes, en particulier la formation d'un mycélium du substrat très fin (chez toutes les colonies) et d'un mycélium aérien très fin aussi (chez la majorité) sont considérées comme étant des actinobactéries.

Le repérage des isolats se fait par l'observation *in situ* à l'œil nu et au microscope optique (grossissement x10 et x40) des colonies d'actinobactéries qui apparaissent à la surface du milieu d'isolement (Shirling et Gottlieb, 1966). La purification est effectuée par la technique des stries (Figure 14). Les colonies sélectionnées sont prélevées délicatement avec une pointe métallique stérile puis purifiées par repiquage successif sur le milieu ISP 2 (Annexe 1), à base de glucose et d'extraits de malt et de levure. Les isolats purifiés sont ensemencés sur le même milieu coulé en

pende dans des tubes à vis. Ces derniers sont incubés à 30 °C pendant 14 jours, puis conservés à 4 °C dans un réfrigérateur (Figure 14).

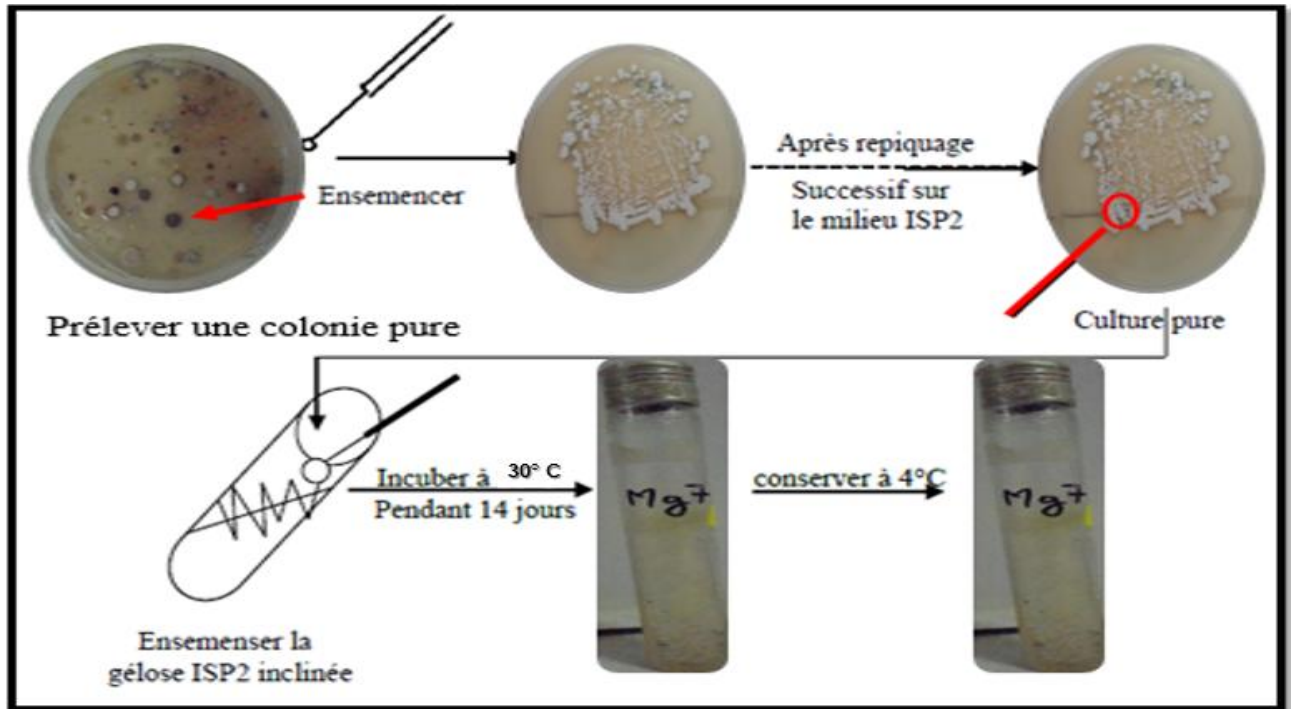


Figure 14. Technique de purification et de conservation des isolats d'actinobactéries.

2. Caractérisation morphologique des isolats

L'étude morphologique des isolats d'actinobactéries est effectuée sur les milieux ISP2 (milieu organique complexe) et ISP4 (milieu synthétique à base d'amidon et de sels-minéraux) (Annexe 1) préconisés à cet effet par Shirling et Gottlieb (1968). Cette étude a été réalisée à l'aide du manuel de Bergey et validée par monsieur le professeur SABAOU directeur du laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM).

2.1. Caractérisation macromorphologique

L'étude macromorphologique consiste à apprécier la croissance (faible, moyenne, bonne) et à déterminer la couleur des mycéliums aériens et du substrat ainsi que celles des pigments solubles s'ils sont sécrétés (Athalye *et al.*, 1981).

2.2. Caractérisation micromorphologique

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique (Optika) à deux grossissements (x40 et x10) après 14 jours d'incubation. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycéliums sans altérer les structures en place. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des

Matériel et méthodes

isolats sélectionnés ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat (Williams *et al.*, 1989).

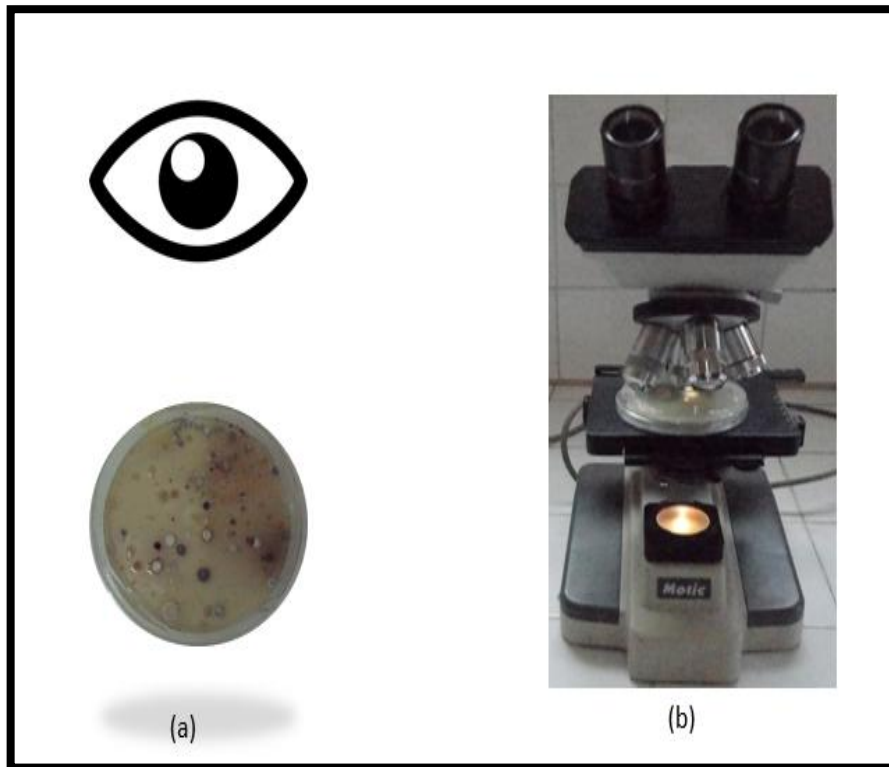


Figure 15. Observation macroscopique à l'œil nu (a) et microscopique (b) des colonies des actinobactéries.

La figure 16 récapitule les différentes étapes suivies, depuis la réalisation de la première suspension de sol jusqu'à l'obtention finale des isolats purs d'actinobactéries.

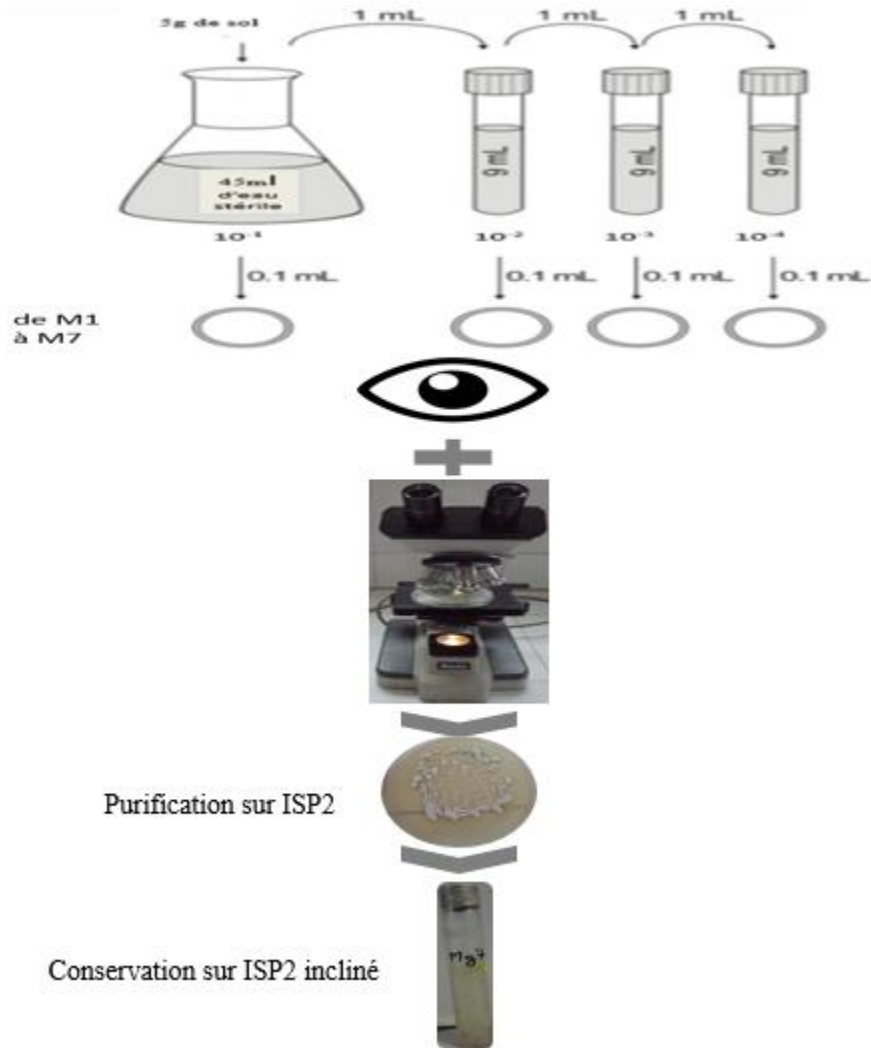


Figure 16. Etapes suivies pour l'obtention des isolats d'actinobactéries.

3. Criblage de l'activité antifongique sur milieu solide

3.1. Préparation des cultures des actinobactéries

L'ensemble des isolats d'actinobactéries sont ensemencés en stries très serrées à la surface du milieu ISP 2 solide coulé en boîtes de Pétri stériles. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 10 jours.

3.2. Préparation des suspensions des champignons-cibles

Les champignons-cibles (4 champignons filamenteux et une levure, tableau 6) sont ensemencés sur le milieu PDA (pour les champignons filamenteux) ou ISP2 (pour la levure) coulés en boîtes de Pétri stériles puis incubés jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance. Les suspensions sont préparées par transfert d'un inoculum du germe-cible dans des tubes à essais contenant de l'eau distillée stérile. Les suspensions sont ensuite bien homogénéisées à l'aide d'un vortex.

3.3. Mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des cylindres de culture

Des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre, supportant les cultures des actinobactéries, sont prélevés à l'aide d'un emporte pièce métallique et stérile, puis déposés à la surface du milieu PDA (Annexe 1) et ISP2 préalablement ensemencé par les champignons-cibles. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 4 °C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances secrétées par les actinobactéries tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C pendant 48 h. L'activité antifongique est évaluée par la mesure, en mm, de diamètre d'inhibition (Figure 17) (Hwang *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2002).

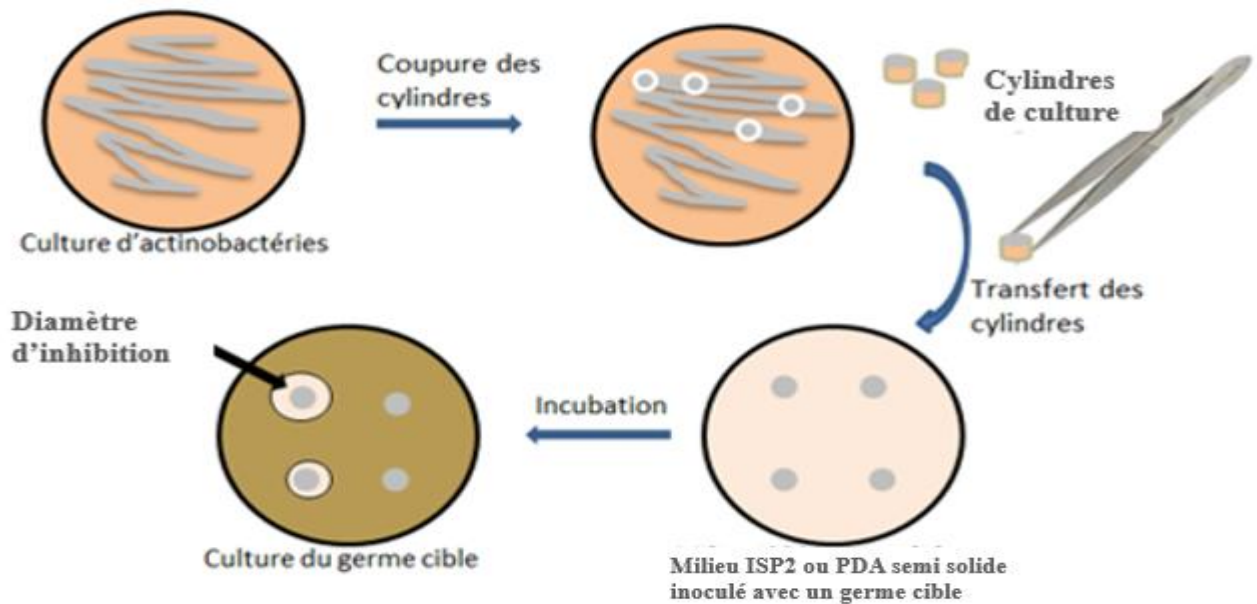


Figure 17. Méthode des cylindres d'agar contenant les cultures (Nalubega, 2016).

* Les milieux PDA et ISP2 contiennent 10 g/l d'agar uniquement, et ce, pour permettre une meilleure diffusion des substances actives.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

1.1. Isolement et origine des actinobactéries mycéliennes

L'isolement des actinobactéries mycéliennes a été effectué à partir de 2 échantillons de sols, provenant de Boumerdès et Mostaganem, sur les milieux Chitine-Vitamines agar (CH-V) et Glycérol-Asparagine-Agar (GAA), additionnés d'agents sélectifs, et incubés à 30°C pendant 10 jours. Ces milieux se sont révélés être très intéressants pour l'isolement et la sélection des actinobactéries.

Au total 88 isolats d'actinobactéries ont pu être choisis sur la base de leur diversité culturale et micromorphologique remarquée lors de l'observation des colonies à l'œil nu et au microscope optique sur les milieux d'isolements. Nous avons prélevé 54 isolats à partir du sol de Mostaganem et 34 isolats du sol de Boumerdès. Les deux milieux utilisés ont permis d'obtenir les actinobactéries et le nombre d'isolats par milieu est compris entre 4 et 18 en tenant compte également des agents sélectifs additionnés ou non (Tableau 8).

Résultats et discussion

Tableau 8. Origine des isolats d'actinobactéries mycéliennes sélectionnés selon les sols et les milieux utilisés.

Sol	Milieu d'isolement	Milieu Chitine-Vitamines agar (CH-V)							Milieu Glycérol-Asparagine-Agar (GAA)				Nombre d'isolats	
		M1		M2		M3		M7	M4	M5	M6			
	Dilution	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³		
Bm	Isolats d'actinobactéries	Bm30	Bm1	Bm12	Bm8			Bm42	Bm14				34	
		Bm32	Bm3		Bm9			Bm43	Bm15					
Bm34	Bm6		Bm10			Bm45	Bm16							
	Bm7					Bm46	Bm17							
	Bm24					Bm48	Bm19							
	Bm25					Bm50	Bm20							
						Bm52	Bm21							
							Bm22							
							Bm23							
							Bm36							
							Bm37							
							Bm39							
							Bm40							
							Bm41							
Mg	Isolats d'actinobactéries	Mg63	Mg52		Mg56	Mg50	Mg64	Mg70	Mg29	Mg14	Mg12	Mg1		54
			Mg53		Mg57	Mg51	Mg69	Mg71	Mg30	Mg15	Mg13	Mg2		
			Mg54		Mg58			Mg73	Mg31	Mg16		Mg3		
			Mg55	-	Mg65			Mg75	Mg32	Mg17		Mg4		
			Mg59		Mg66					Mg18		Mg5		
			Mg60		Mg67					Mg19		Mg6		
			Mg62							Mg20		Mg7		
										Mg21		Mg8		
										Mg22		Mg9		
										Mg23		Mg10		
										Mg24		Mg11		
										Mg25				
										Mg26				
										Mg27				
								Mg28						
Total		17		10		4		11	18		15		13	88

Bm = sol de Boumerdès. Mg = sol de Mostaganem. - = aucun isolat n'a été sélectionné. M1 = CH-V + actidione (50mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l) ; M2 = M1 + lysozyme (100 mg/l). M3 = M1+polymyxine (25 mg/l) ; M7 = M1+ lysozyme (500 mg/l) ; M4 = GAA+ actidione (50 mg/l) + acide nalidixique (10 mg/l) ; M5 = M4 + lysozyme (100 mg/l), M6 = M4 + polymyxine (25 mg/l).

1.2. Caractérisation morphologique des actinobactéries mycéliennes et détermination présomptive des genres

La micromorphologie des 88 isolats d'actinobactéries sélectionnés a été examinée au microscope optique sur les milieux ISP2 et ISP4. Ceci nous a permis de les rattacher de manière présomptive à 7 genres différents (Tableau 9), et ce, sous réserve d'une analyse moléculaire qui permettra dans le futur de statuer définitivement sur leur identification.

Tableau 9. Répartition des isolats d'actinobactéries selon les genres correspondants.

Isolats d'actinobactéries	Nombre d'isolats	Genre correspondant	Isolats d'actinobactéries	Nombre d'isolats	Genre correspondant
Bm1, Bm10, Bm14, Bm15, Bm16, Bm19, Bm22, Bm24, Bm25, Bm36, Bm40, Bm41, Mg15, Mg16, Mg17, Mg18, Mg19, Mg21, Mg27, Mg32, Mg54, Mg55, Mg56, Mg58, Mg60 et Mg62	26	<i>Streptomyces</i> (type S)	Mg63 et Mg66	2	<i>Actinomadura</i>
			Bm3, Bm30, Bm32, Bm34, Bm43, Bm50, Bm52, Mg8, Mg65, Mg70, Mg73 et Mg75	12	<i>Saccharothrix</i>
Bm7, Bm8, Bm12, Bm17, Bm20, Bm21, Bm37, Bm39, Mg9, Mg10, Mg11, Mg13, Mg20, Mg24, Mg25, Mg29, Mg50, Mg51, Mg52, Mg53 et Mg57	21	<i>Streptomyces</i> (type RF)	Mg12 et Mg69	2	<i>Nocardopsis</i>
			Bm6, Bm9, Bm48, Mg1, Mg67 et Mg71	6	<i>Amycolatopsis</i>
			Mg2, Mg3, Mg4, Mg5, Mg6, Mg7, Mg22, Mg23, Mg26, Mg28, Mg30 et Mg64	12	<i>Nocardia</i>
Bm23	1	<i>Streptomyces</i> (type RA)			
Mg14 et Mg31	2	<i>Streptomyces</i> (type SRA)			
Mg59	1	<i>Streptomyces</i> (type SRF)	Bm42, Bm45 et Bm46	3	<i>Actinoplanes</i>

1.2.1. Isolats du genre *Streptomyces*

La plupart des isolats sectionnés (51 isolats ; soit près de 58%) sont rattachés au genre *Streptomyces*. Ils sont caractérisés par un mycélium du substrat qui ne se fragmente pas et un mycélium aérien qui produit des chaînes de spores plus ou moins longues (10 à 50 spores par chaîne en général) portées par des sporophores bien développés. Ces chaînes peuvent être spiralées (type S = *Spira*), en boucle et/ou en crochets (type RA = *Retinaculum Apertum*) ou encore droites à flexueuses (type RF = *Rectus Flexibilis*). Certains isolats possèdent à la fois les types S et RA (= SRA) ou S et RF (= SRF) (Figure 18).

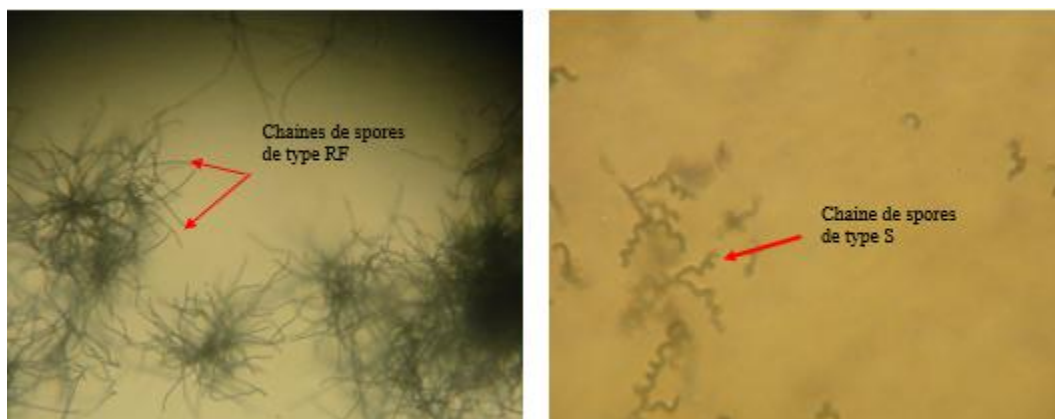


Figure 18. Micromorphologie du mycélium aérien des isolats Bm7 à gauche et Bm16 à droite poussant sur le milieu ISP2 et observée au microscope photonique (G x100 avec effet de zoom).

La majorité des isolats appartenant au genre *Streptomyces* a montré une bonne croissance sur les deux milieux testés, avec cependant une meilleure croissance sur le milieu ISP2 pour certains d'entre eux. Ces isolats sont caractérisés par la présence d'un mycélium aérien de couleur très variée (gris, blanc, beige, rose, bleu). Le mycélium du substrat est en général beige à brun jaunâtre (sauf pour certains). Les pigments diffusibles sont sécrétés uniquement par certains isolats, avec trois couleurs dominantes : le brun, le rose et le jaune (Tableau 10, Figure 19).

Tableau 10. Caractéristiques culturelles des souches de *Streptomyces*.

Isolats		Milieux	Croissance	MA	MS	PS
Streptomyces de type S	Bm41, Bm25, Bm24, Bm22, Bm19, Bm16, Bm15, Bm14, Bm10, Bm1, Mg60, Mg62, Mg56, Mg55, Mg32, Mg27 et Mg21	ISP2	++ à ++++	Gris	Beige brunâtre	–
		ISP4	++ à ++++	Gris	Beige	–
	Mg15, Mg18, Mg54 et Mg58	ISP2	+++ à ++++	Bleu	Brun	–
		ISP4	++ à +++	Bleu	Beige	–
	Mg 17 et Mg19	ISP2	++ à ++++	Blanc	Brun clair	–
		ISP4	++ à ++++	Gris clair	Beige	–
	Mg16	ISP2	+++	Blanc rosâtre	Brun	Brun

Suite du tableau 10

<i>Streptomyces</i> type SRA	Mg14	ISP2	++	Gris foncé	Beige	-
		ISP4	++	Gris foncé	Beige	-
	Mg31	ISP2	++++	Blanc beige	Brun jaunâtre	-
		ISP4	+++	Beige	Beige	-
<i>Streptomyces</i> type SRF	Mg59	ISP2	++++	Gris	Brun jaunâtre	Brun
		ISP4	+++	Gris	Beige	-

MA = mycélium aérien ; MS = mycélium du substrat ; PS = pigments solubles ; - = absence de pigments diffusibles ; + = croissance faible ; ++ = croissance moyenne ; +++ = bonne croissance ; ++++ = très bonne croissance.

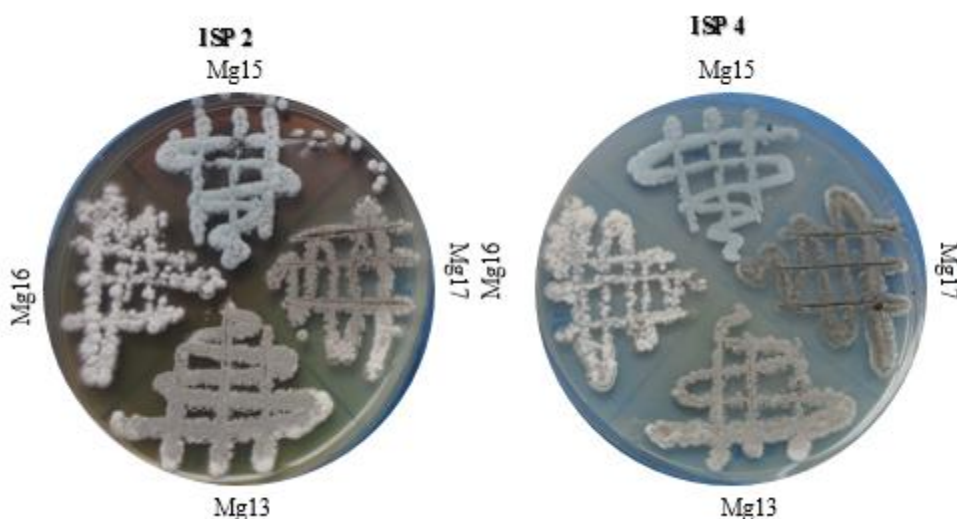


Figure 19. Aspect du mycélium aérien des isolats Mg13, Mg15, Mg16 et Mg17.

1.2.2. Isolats du genre *Actinomadura*

Deux isolats d'actinobactéries (soit 2,3%) ont montré les caractéristiques micromorphologiques du genre *Actinomadura*. Le mycélium du substrat ne se fragmente pas et le mycélium aérien porte des chaînes de spores très courtes (3 à 10 spores, plus rarement 15) portées par de très courts sporophores. Ces chaînes peuvent être soit en boucle et/ou en crochets (type RA = *Retinaculum Apertum*), droites à flexueuses (type RF = *Rectus Flexibilis*) (Figure 20) et parfois spiralées, avec des spires de un à deux tours (type S = *Spira*).



Figure 20. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat Mg63 poussant sur le milieu ISP2 et observée au microscope photonique (G x 400 avec effet de zoom).

Les deux isolats de ce genre présentent une bonne croissance sur le milieu ISP2 et une croissance faible sur le milieu ISP4. La couleur des mycéliums aérien et du substrat change selon le milieu de culture utilisé. L'isolat Mg 63 produit un pigment brun ; en revanche, l'isolat Mg66 ne sécrète pas de pigments (Tableau 11, Figure 21).

Tableau 11. Caractéristiques culturales des isolats d'*Actinomadura*.

Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
Mg63	ISP2	+++	Gris-brun	Brun très foncé	Brun foncé
	ISP4	++	Beige brunâtre	Brun	Brun
Mg66	Isp2	+++	Rose saumon	Brun-beige clair	-
	Isp4	+	Blanc	beige très pale	-

MA = mycélium aérien; **MS** = mycélium du substrat; **PS** = pigments solubles; - = absence de pigments diffusibles; + = croissance faible; ++ = croissance moyenne; +++ = bonne croissance.

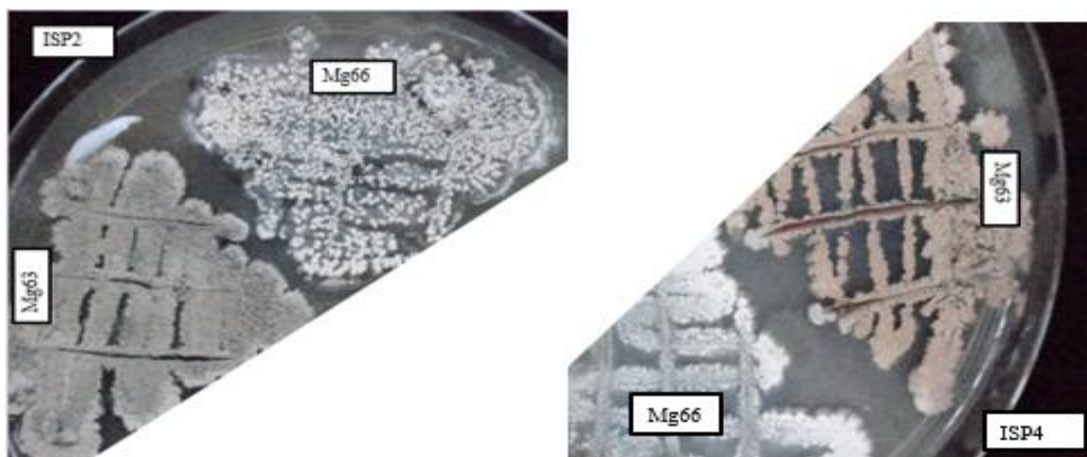


Figure 21. Aspect du mycélium aérien des isolats Mg63 et Mg66.

1.2.3. Isolats du genre *Saccharothrix*

Douze isolats d'actinobactéries (soit 13,6%) sont rattachés au genre *Saccharothrix*. Ces isolats possèdent un mycélium du substrat fragmenté et un mycélium aérien qui se fragmente entièrement et de manière anarchique en de très longues chaînes de spores, irrégulières ou parfois en zig-zag, et sans espaces entre les spores (Figure 22). Contrairement aux genres *Streptomyces* et *Actinomadura*, il n'y a pas de sporophores.



Figure 22. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat Mg 75 poussant sur milieu ISP2 et observée au microscope photonique. (G x 400 avec effet de zoom). MA = mycélium aérien.

Les isolats de ce genre montrent une meilleure croissance sur le milieu ISP2. Le mycélium aérien est blanc à beige et le mycélium du substrat est jaune pour certains isolats et brun pour d'autres. Les pigments diffusibles (de couleur brune ou orange) sont sécrétés par certains isolats uniquement (Tableau 12, Figure 23).

Tableau 12. Caractéristiques culturelles des isolats de *Saccharothrix*.

Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
Mg75, Mg73, Bm50, Bm43 et Bm34	ISP2	++ à ++++	Blanc	Jaune	–
	ISP4	+ à +++	Blanc à beige	Jaune	–
Bm52 et Bm3	ISP2	+++	–	Brun	Brun
	ISP4	+ à +++	Blanc	Brun	Brun
Bm32 et Bm30	ISP2	++ à +++	Beige	Brun foncé	Brun foncé
	ISP4	+ à ++	Beige	Brun clair	Brunâtre
Mg65 et Mg70	ISP2	+++	–	Brun	–
	ISP4	+ à ++	Blanc	Beige clair	–
Mg8	ISP2	+++	Beige	Jaune doré	Orange
	ISP4	++	Beige	Orange pâle	Orange

MA = mycélium aérien; MS = mycélium du substrat; PS = pigments solubles; - = absence de MA ou de PS; + = croissance faible, ++ = croissance moyenne, +++ = bonne croissance.

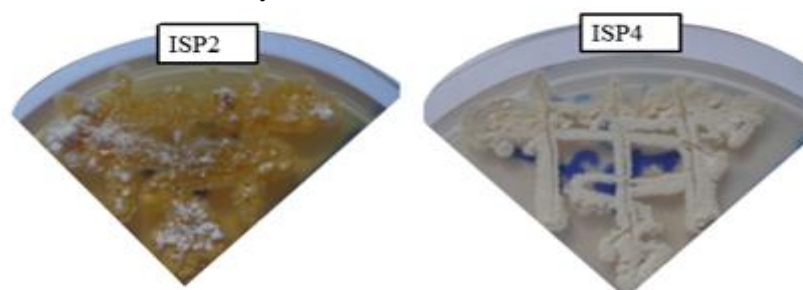


Figure 23. Aspect du mycélium aérien de l'isolat Mg75.

1.2.4. Isolats du genre *Nocardiopsis*

Deux isolats d'actinobactéries (soit 2,3%) possèdent un mycélium du substrat plus ou moins fragmenté et un mycélium aérien qui se fragmente totalement et de manière très irrégulière (en zigzag) en de longues chaînes de spores très bien individualisées et parfois espacées entre elles (Figure 24). Ces caractéristiques sont ceux du genre *Nocardiopsis*, qui ressemble beaucoup à *Saccharothrix*, avec comme principale différence morphologique la présence d'espaces caractéristiques entre les spores.

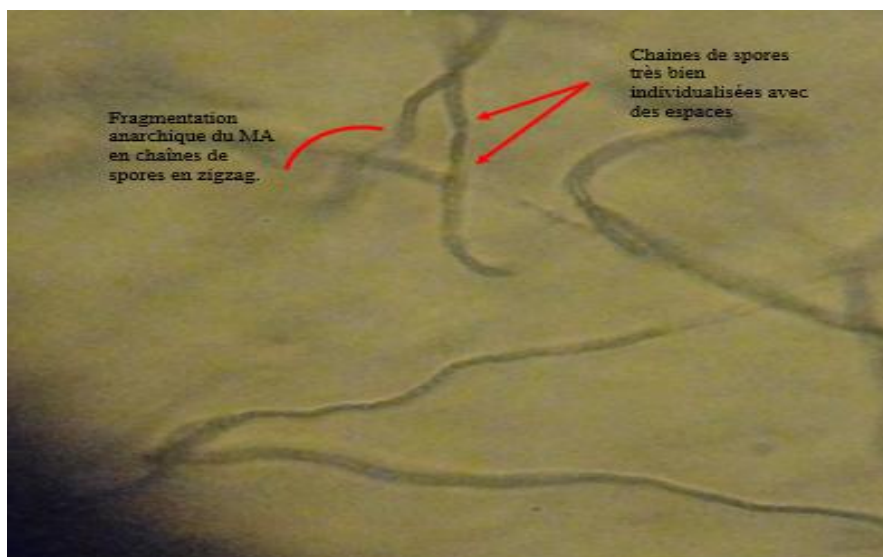


Figure 24. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat Mg12 poussant sur milieu ISP2 et observé au microscope photonique (G x 400 avec effet de zoom).

Les isolats de ce genre sont caractérisés par une bonne croissance sur le milieu ISP2 et une croissance moyenne sur le milieu ISP4. Le mycélium aérien est rose-violet pour l'isolat Mg12 et beige pâle pour l'isolat Mg69, et ce, sur les deux milieux de culture (ISP2 et ISP4). La couleur du mycélium du substrat est brun foncé (Mg12) ou orange jaunâtre sur le milieu ISP2 et blanche sur le milieu ISP4. La souche Mg12 produit des pigments solubles bruns sur le milieu ISP2 uniquement (Tableau 13, Figure 25).

Tableau 13. Caractéristiques culturelles des isolats de *Nocardioopsis*.

Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
Mg12	ISP2	+++	Rose-violet	Brun foncé	Brun
	ISP4	+++	Rose-violet	Blanc	-
Mg69	Isp2	+++	Beige pâle	Orange jaunâtre	-
	Isp4	++	Beige pâle	Blanc	-

MA = mycélium aérien ; **MS** = mycélium du substrat ; **PS** = pigments solubles ; - = absence de PS ; + + = croissance moyenne ; + + + = bonne croissance.

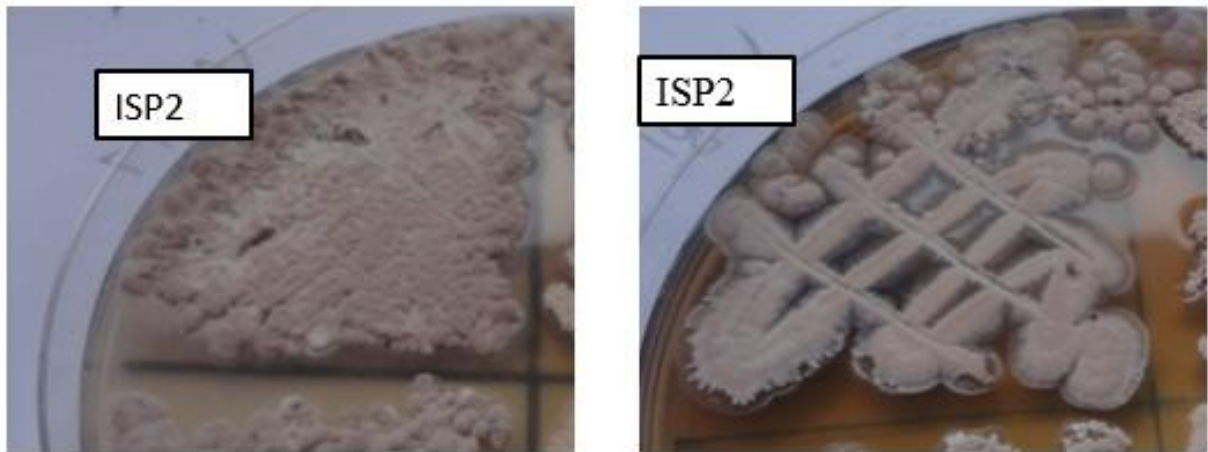


Figure 25. Aspect du mycélium aérien de l'isolat Mg12.

1.2.5. Isolats du genre *Nocardia*

Douze isolats d'actinobactéries (soit 13,6%) ont montré les caractéristiques micromorphologiques du genre *Nocardia*. Le mycélium du substrat se fragmente excessivement en zig-zag. Le mycélium aérien est constitué de filaments généralement courts, non fragmentés (stériles) ou peu fragmentés en éléments en bâtonnets ou coccoïdes (Figure 26).

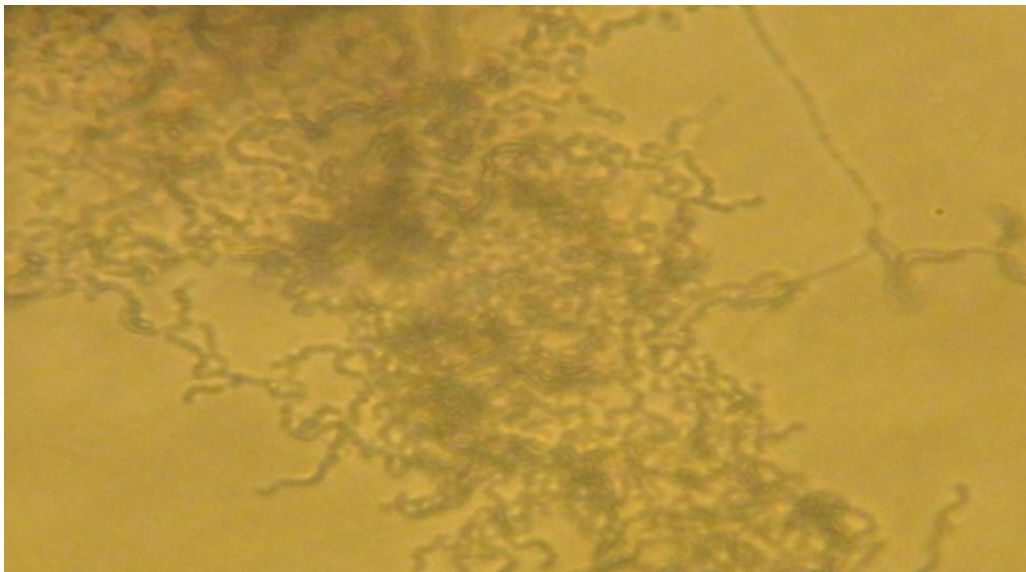


Figure 26. Micromorphologie du mycélium du substrat (MS) de l'isolat Mg64 poussant sur le milieu ISP2 et observée au microscope photonique (G x 400 avec effet de zoom). La fragmentation (en zig-zag) du MS est excessive.

Les isolats ont une croissance moyenne à bonne sur le milieu ISP2 et une croissance très faible (à l'exception de l'isolat Mg23) sur le milieu ISP4. Le mycélium aérien est blanc ou rose sur le milieu ISP2 et blanc sur ISP4. Pour la majorité des isolats, le mycélium du substrat est orange ou

Résultats et discussion

jaune-orange sur ISP2 et beige sur ISP4. On note l'absence de pigments solubles chez les douze isolats de ce genre (Tableau 14, Figure 27).

Tableau 14. Caractéristiques culturelles des isolats de *Nocardia*.

Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
Mg22, Mg2, Mg3, Mg4, Mg26 et Mg64.	ISP2	++	Rose	Orange	–
	ISP4	+/-	Blanc	Beige	–
Mg5, Mg6, Mg7, Mg30 et Mg28.	ISP2	++ à +++	Blanc	Jaune orange	–
	ISP4	+/-	Blanc	Beige	–
Mg23	ISP2	++ à +++	Blanc	Jaune clair	–
	ISP4	++ à +++	Blanc	Jaune pâle	–

MA = mycélium aérien ; **MS** = mycélium du substrat ; **PS** = pigments solubles ; - = absence de PS ; +/- = croissance très faible; ++ = croissance moyenne; +++ = bonne croissance.

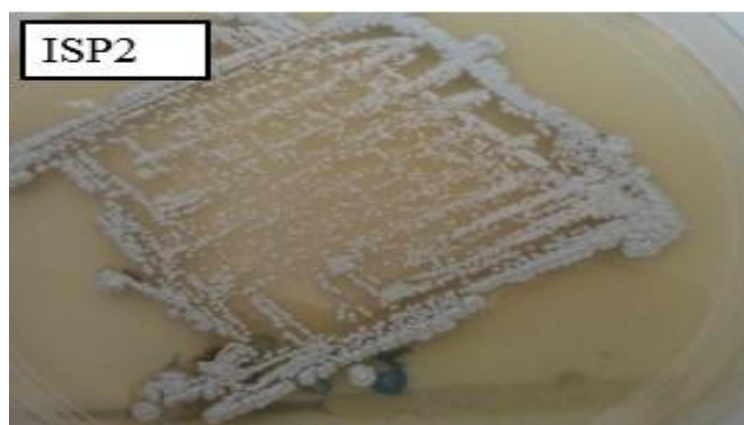


Figure 27. Aspect du mycélium aérien de l'isolat Mg22.

1.2.6. Isolats du genre *Amycolatopsis*

Six isolats d'actinobactéries (soit 6,8%) ont été rattachés au genre *Amycolatopsis*. Leur mycélium du substrat est très fragmenté et leur mycélium aérien (filaments très longs) se fragmente également en éléments de forme allongée (bâtonnets) très fins. Cette fragmentation est plus ou moins irrégulière, parfois en zig-zag. Les fragments (qui ne sont pas des spores comme chez *Nocardioopsis* ou *Saccharothrix*) sont à peine visibles (Figure 28) contrairement aux chaînes de spores de ces deux derniers genres.



Figure 28. Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat Bm48 poussant sur le milieu ISP2 et observée au microscope photonique (G x 400 avec effet de zoom).

Les isolats de ce genre sont caractérisés par une bonne croissance sur le milieu ISP2 et moyenne sur le milieu ISP4. La couleur du mycélium aérien est blanche pour la majorité des isolats sur les deux milieux testés. En revanche, le mycélium du substrat peut être brun, jaune ou orange selon les isolats. Les pigments diffusibles ne sont pas sécrétés (Tableau 15, Figure 29).

Tableau 15. Caractéristiques culturelles des isolats d'*Amycolatopsis*.

Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
Bm6	ISP2	+ à ++	Blanc	Brun	–
	ISP4	++	Blanc beige	Brun	–
Bm9 et Mg 67	ISP2	+++ à ++++	Beige pâle	Jaune	–
	ISP4	++ à +++	Beige pâle	Beige	–
Bm48	ISP2	++++	Jaune grisâtre	Brun foncé	–
	ISP4	++ à +++	Blanc	Jaune clair	–
Mg71	ISP2	+	–	Beige	–
	ISP4	+	Blanchâtre, rosâtre à violacé	Brun clair	–
Mg 1	ISP2	+++	Blanc beige	Orange clair	–
	ISP4	+ à ++	Beige	Blanc orangé	–

MA = mycélium aérien ; **MS** = mycélium du substrat ; **PS** = pigments solubles ; - = absence du MA ou des PS ; + = croissance faible, ++ = croissance moyenne, +++ = bonne croissance, ++++ = très bonne croissance.

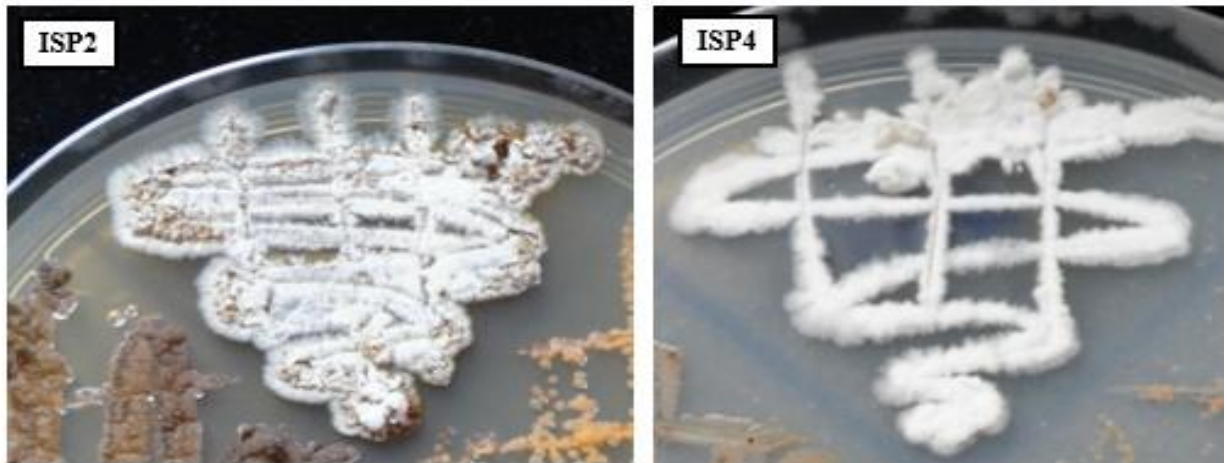


Figure 29. Aspect du mycélium aérien de l'isolat Bm48.

1.2.7. Isolats du genre *Actinoplanes*

Trois isolats d'actinobactéries (soit 3,4%) appartiennent au genre *Actinoplanes*. Leur mycélium du substrat produit des sporangiophores qui portent des sporanges globuleux ou plus ou moins irréguliers, contenant à l'intérieur des chaînes de spores mobiles (Figure 30). Le mycélium aérien n'est pas produit.



Figure 30. Micromorphologie du mycélium du substrat montrant les sporanges globuleux de l'isolat Bm42 poussant sur le milieu ISP2, observée au microscope photonique (G x 400 avec effet de zoom).

Les isolats de ce groupe sont caractérisés par une bonne croissance sur le milieu ISP2 et une croissance faible à moyenne sur le milieu ISP4. Le mycélium aérien est absent chez tous les isolats. Le mycélium du substrat est jaune orangé pour les isolats Bm45 et Bm46 et brun foncé à clair pour l'isolat Bm42. Les pigments solubles ne sont pas produits (Tableau 16, Figure 31).

Résultats et discussion

Tableau 16. Caractéristiques culturelles des isolats d'*Actinoplanes*.

Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
Bm45 et Bm46	ISP2	++ à +++	–	Jaune orangé	–
	ISP4	+	–	Jaune orangé	–
Bm42	ISP2	+++ à +++++	–	Brun foncé	–
	ISP4	+ à ++	–	Brun clair	–

MA = mycélium aérien ; MS = mycélium du substrat ; PS = pigments solubles ; - = absence du MA ou de PS ; + = croissance faible ; ++ = croissance moyenne ; +++ = bonne croissance ; +++++ = très bonne croissance.

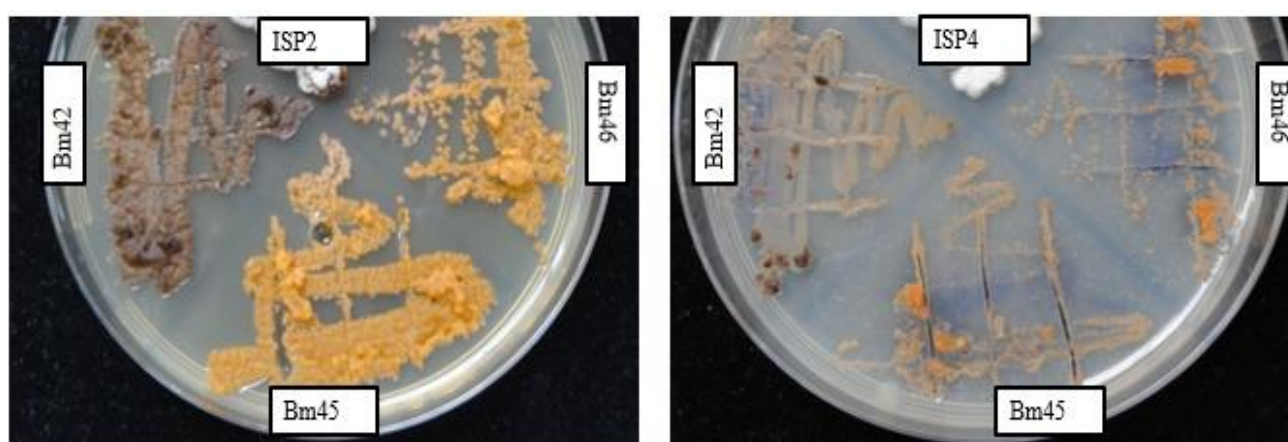


Figure 31. Aspect du mycélium du substrat des isolats Bm42, Bm45 et Bm46.

1.3. Effet du milieu d'isolement sur la diversité des actinobactéries mycéliennes cultivables

Parmi les 88 isolats d'actinobactéries sélectionnés, 51 ont présenté les caractéristiques morphologiques du genre *Streptomyces*, dont 32 isolats ont été prélevés à partir du milieu GAA et 19 isolats du milieu CH-V. Les 37 isolats restants appartiennent à 6 genres connus dans le monde pour être rares ou peu fréquents (*Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Saccharothrix* et *Nocardiopsis*) dont la plupart (23 Isolats) se sont développés sur le milieu CH-V (Figure 32). En effet, le milieu CH-V avec ou sans agents sélectifs a permis de sélectionner certains genres rares comme c'est le cas d'*Actinomadura* et d'*Actinoplanes* (Figure 32). Ces résultats montrent que le milieu CH-V est plus favorable à la croissance des genres rares que le milieu GAA.

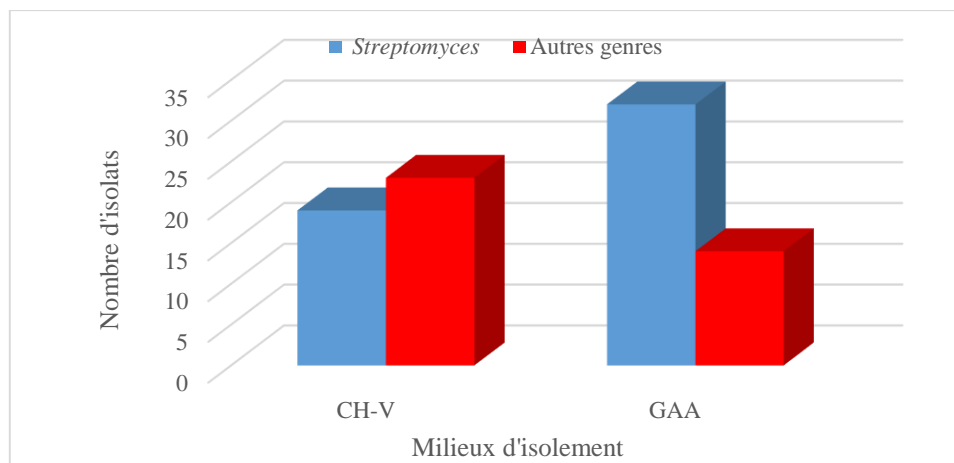


Figure 32.Répartition des isolats appartenant au genre *Streptomyces* et à d'autres genres selon les milieux d'isolement.

1.4. Effet des agents sélectifs sur la diversité des actinobactéries mycéliennes

Il est aussi important de noter l'effet intéressant de l'addition des agents sélectifs des actinobactéries aux deux milieux utilisés (CH-V et GAA) sur la sélection des isolats d'actinobactéries. En effet, les milieux de base M1 et M4 ont favorisé la croissance des *Streptomyces* au détriment des genres rares (11 isolats sur le milieu M1 et 17 isolats sur le milieu M4). L'ajout de 100 mg/L de lysozyme à ces milieux de base a favorisé la croissance de certains genres rares tels que *Saccharothrix* sur le milieu M2 et *Nocardia* sur le milieu M5. L'augmentation de la concentration du lysozyme à 500 mg/L dans le milieu de base CH-V a permis d'obtenir un nombre plus important de souches de *Saccharothrix* et d'*Amycolatopsis*. L'utilisation de la polymyxine a permis la mise en évidence de *Nocardiosis* qui est obtenu sur les milieux M3 et M6 uniquement et d'obtenir *Nocardia* sur le milieu M3 et avec un nombre plus élevé sur le milieu M6 (Figure 33).

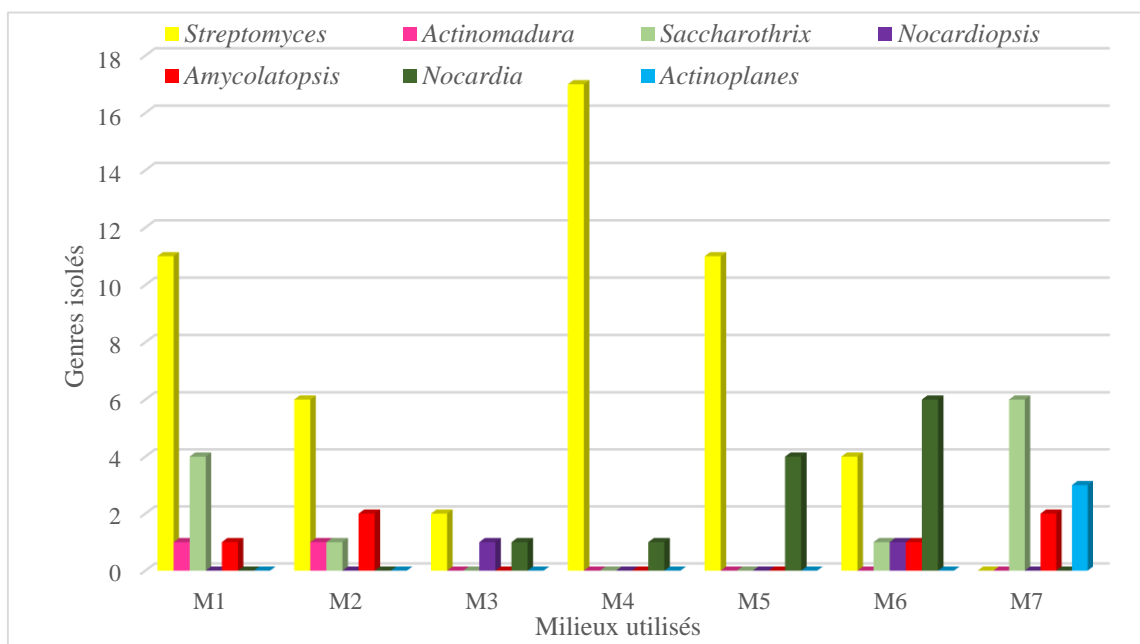


Figure 33. Répartition des genres d'actinobactéries selon les milieux d'isolement.

1.5. Distribution des genres dans les sols analysés

Les isolats retrouvés dans les échantillons diffèrent du point de vue qualitatif. Le sol de Mostaganem est plus diversifié en genres d'actinobactéries (6 genres différents) par rapport au sol de Boumerdès (4 genres).

Les genres *Streptomyces*, *Saccharothrix* et *Amycolatopsis* sont retrouvés dans les deux échantillons de sols analysés avec une dominance du genre *Streptomyces*. Le sol de Boumerdès a permis d'isoler 21 souches de *Streptomyces* (61,7%), 7 souches de *Saccharothrix* (20,6%), 3 souches d'*Amycolatopsis* (8,8%) et 3 souches d'*Actinoplanes* (8,8%). Les 54 isolats retrouvés dans l'échantillon Mg regroupent 30 souches de *Streptomyces* (55,5%), 12 souches de *Nocardia* (22,2%), 5 souches de *Saccharothrix* (9,2%), 3 souches d'*Amycolatopsis* (5,5%), 2 souches d'*Actinomadura* (3,4%) et 2 souches de *Nocardia* (3,4%) (Figure 34).

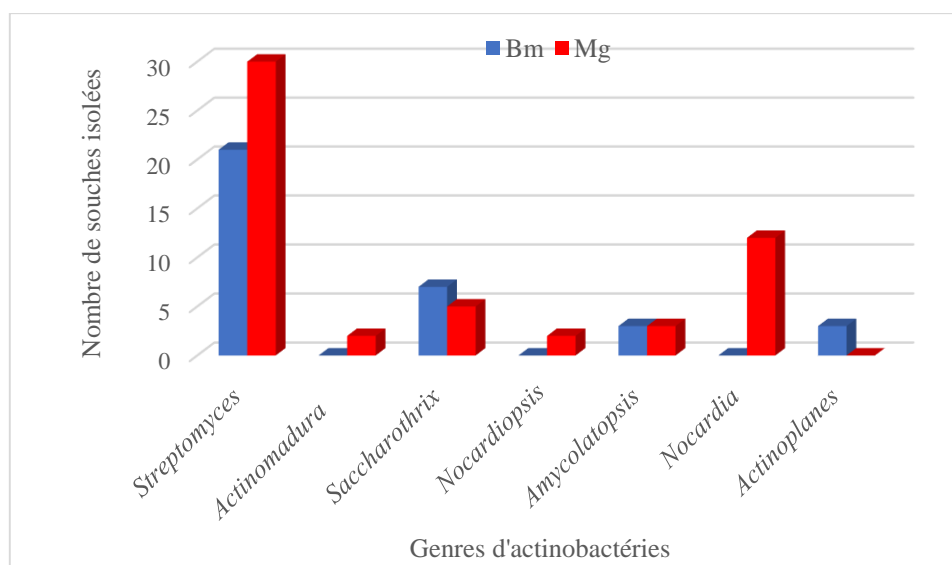


Figure 34. Distribution des genres d'actinobactéries identifiés dans les sols analysés.

1.6. Discussion

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram-positif dont le pourcentage en guanine-cytosine est supérieur à 55% et dont la plupart sont mycéliennes. C'est l'un des groupes bactériens les plus versatiles et les plus importants du point de vue écologique et biotechnologique. En effet, ces microorganismes ont une grande capacité à produire de nombreuses molécules bioactives tels que les antibiotiques (Loqman, 2009).

La recherche de différents genres ayant une activité antifongique a été étudiée à partir de deux sols du nord de l'Algérie. Parmi toutes les différentes niches écologiques, le sol a été choisi car il héberge différents types de micro-organismes dont les actinobactéries constituent l'un des grands groupes de cette population (Kumar *et al.*, 2003).

L'isolement des actinobactéries a été effectué sur le milieu CH-V préconisé par différents auteurs (Hayakawa et Nonomura, 1984; Boudjella, 1994; Pathom-Aree *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Meklat *et al.*, 2012). Ce milieu est à base de sels minéraux et de chitine comme unique source de carbone et d'azote. Ce substrat est l'élément sélectif qui favorise la croissance des actinobactéries mycéliennes au détriment des bactéries non mycéliennes. Le milieu CH-V a permis la mise en évidence de nombreuses colonies d'actinobactéries à partir des deux sols. Ces microorganismes ont pu se développer au détriment des bactéries non mycéliennes et des champignons en produisant des chitinases pour utiliser la chitine en tant que source de carbone et d'azote à la fois (Dommergues et Manganot, 1970). En effet, les actinobactéries mycéliennes

dégradent mieux la chitine par rapport aux autres microorganismes qui la dégradent difficilement ou pas.

Le milieu GAA a été aussi utilisé comme milieu d'isolement. Ce milieu est considéré parmi les meilleurs milieux destinés pour l'isolement des actinobactéries à partir des échantillons de sol (George *et al.*, 2010). Ce milieu de culture favorise la croissance des actinobactéries car il contient le glycérol comme principale source de carbone. En effet, l'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote (chitine, glycérol et asparagine) rend le milieu de culture moins favorable au développement des autres bactéries (Jihani *et al.*, 2012).

Les deux milieux d'isolement contiennent aussi des vitamines du groupe B comme facteurs de croissance et cela permet aux actinobactéries appartenant aux genres relativement rares, et qui sont souvent auxotrophes pour ces vitamines, de croître (Hayakawa et Nonomura, 1984).

Si l'actidione (antifongique) empêche la croissance des champignons, l'addition d'agents chimiques antibactériens aux milieux de culture utilisés (CH-V et GAA), tels que la polymyxine B, l'acide nalidixique et le lysozyme, ont permis d'éliminer ou de diminuer fortement le nombre de bactéries non mycéliennes indésirables, tout en éliminant aussi de nombreuses actinobactéries, favorisant ainsi la mise en évidence de souches particulières, peu fréquentes à rares (Boudjella, 1994) autres que les *Streptomyces* qui sont dominants dans les sols (Sabaou *et al.*, 1998). Ces agents sélectifs ont été utilisés dans le but d'avoir une plus grande diversité de genres, et aussi d'avoir des isolats de *Streptomyces* assez particuliers qui pourraient être des souches productrices de molécules antifongiques.

Le lysozyme est une enzyme qui digère la paroi cellulaire muréique des bactéries en coupant la liaison glycosidique β (1-4) entre l'acide N-acétylmuramique (NAM) et la N-acétylglucosamine (NAG) (Callewaert *et al.*, 2012). Cependant, certaines actinobactéries résistent à cette enzyme comme est le cas des membres de la famille des *Pseudonocardiaceae* (Manuel de Bergey, 2012).

L'acide nalidixique est un inhibiteur de l'ADN gyrase bactérienne. Cet antibiotique bloque l'action de cette enzyme qui, par son action sur l'enroulement de l'ADN, est essentielle à la réplication de l'ADN et à la transcription (Woolley *et al.*, 2017). Il est principalement efficace sur les bactéries Gram négatif. En faible concentration, son effet est bactériostatique et en grande concentration, il est bactéricide (Bhat *et al.*, 2005).

La polymyxine B est un antibiotique polypeptidique actif sur les bactéries à Gram négatif, en s'insérant dans les membranes lipidiques externes et cytoplasmiques. L'effet bactéricide est dû à

une déstabilisation de la bicouche phospholipidique qui modifie la perméabilité et favorise ainsi la fuite des constituants cytoplasmiques (Kohanski *et al.*, 2010).

Les isolats de *Streptomyces* poussent dans les milieux CH-V et GAA. Leur croissance est appréciable sur ces deux milieux grâce à l'utilisation du glycérol du milieu GAA et de la chitine du milieu CH-V (Tadijan *et al.*, 2014).

Le milieu CH-V nous a permis d'isoler des actinobactéries rares ainsi que des *Streptomyces*. En effet, Khanna *et al.* (2011) ont montré que les milieux sélectifs appropriés contenant des macromolécules comme la chitine sont très utilisés pour favoriser la croissance des actinobactéries rares présentes dans les échantillons de sol en supprimant et/ou en entravant les colonies bactériennes et fongiques contaminantes.

A partir de nos échantillons de sol, plusieurs genres ont été isolés. Selon Kumar *et al.* (2003), le sol héberge différents types de micro-organismes. Les actinobactéries sont l'un des grands groupes de la population de sol. Elles sont très diversifiées en genres. Le genre le plus abondant est *Streptomyces* qui peut former plus 80% de la totalité des actinobactéries telluriques, suivi de *Nocardia* et de *Micromonospora* qui représentent jusqu'à 15% de l'ensemble de la population, le reste étant des genres rares ou peu fréquents (Dommergues et Mangenot, 1970; Sabaou *et al.*, 1998; Biswas et Mukherjee, 2001).

A partir des deux échantillons de sol étudiés, sept genres d'actinobactéries ont été isolés : *Streptomyces*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis* et *Actinoplanes*.

Les *Streptomyces* se trouvent dans tous les milieux terrestres et aquatiques ainsi que les environnements symbiotiques et endophytiques (Xiao *et al.*, 2009). Ils sont très abondants dans les sols riches en matière organique en décomposition (Holt *et al.*, 1994). Ils représentent le genre le plus abondant de la population des actinobactéries dans le sol et sont responsables de l'odeur caractéristique de la terre mouillée (moisi) grâce à la sécrétion d'un composé volatil, la géosmine (Katsifas *et al.*, 1999; Zaitlin *et al.*, 2003).

Les *Nocardia* sont ubiquitaires dans l'environnement. Elles peuvent être saprophytes et présentes dans les composés organiques, dans les eaux douces et salées et dans les sols. Les espèces de *Nocardia* peuvent aussi être retrouvées dans la poussière, le sol des jardins, le sable des plages et l'eau de piscines, mais certaines espèces sont pathogènes pour l'homme et provoquent des nocardioses (Brown-Elliott *et al.*, 2006; Soraa *et al.*, 2009; Sullivan et Chapman, 2010).

Le sol est l'écosystème à partir duquel la majorité des espèces de *Saccharothrix* ont été isolées. La première espèce assignée à ce genre, *S. australiensis* ATCC 31947^T, a été isolée du sol d'Australie (Labeda *et al.*, 1984). Beaucoup d'espèces ont été isolées de sols du Sahara algérien, et six d'entre elles, *S. algeriensis* SA 233^T, *S. hoggarensis* SA181^T, *S. saharensis* SA152^T, *S. tamanrassetensis* SA198^T, *S. isguenensis* ...^T et *S. ghardaiensis* MB46^T ont été décrites et publiées comme nouvelles espèces (Zitouni *et al.*, 2004; Boubetra *et al.*, 2013a,b ; Boubetra *et al.*, 2015 ; Bouznada *et al.*, 2016 ; Bouznada *et al.*, 2017).

Le genre *Nocardiopsis* a été détecté dans plusieurs pays à travers le monde, mais toujours en petite quantité. Il a été isolé à partir de plusieurs sols en Algérie par Zitouni *et al.*, (2005) et Meklat *et al.*, (2011). Une nouvelle espèce, appelée *N. algeriensis*, a été isolée d'un sol de la région d'Adrar et décrite par Bouras *et al.* (2015)

Les espèces du genre *Actinomadura* sont aussi retrouvées dans les sols. Elles ont été isolées de plusieurs sites géographiques de par le monde, comme les sols du Japon (Gyobu et Miyadoh, 2001) et les sols arides en Algérie (Badji *et al.*, 2007). Deux nouvelles espèces, *Actinomadura algeriensis* et *A. adrarensis* ont été mises en évidence par Lahoum *et al.* (2016a,b) dans les sols du Hoggar et d'Adrar respectivement.

Plusieurs souches appartenant au genre *Amycolatopsis* ont été isolées du sol et des légumes, bien que leur rôle dans ces milieux n'ait pas été étudié. Par contre, les souches d'*Actinoplanes* peuvent dégrader les composés organiques complexes en tant qu'habitants saprophytes typiques du sol (Manuel de Bergey, 2012).

Cependant, la diversité des genres d'actinobactérie diffère d'un sol à un autre. Ceci a été démontré par plusieurs auteurs dont Biswas et Mukherjee (2001) qui mentionnent que, tout comme les bactéries et les champignons, les actinobactéries sont influencées par les facteurs environnementaux tels que le pH, l'eau, la température et la teneur en matière organique du sol. Les actinobactéries sont en général des organismes aérobies hétérotrophes et ont besoin de beaucoup de matière organique, une quantité d'eau optimale et une bonne aération pour leur croissance.

2.1. Evaluation du potentiel antifongique des actinobactéries

L'activité antifongique des 88 isolats d'actinobactéries a été évaluée contre *Phaeoconiella chlamydospora* (P), *Phaeoacremonium aleophilum* (M), *Aspergillus carbonarius* (AC), *Fusarium culmorum* (Fc) et *Candida albicans* (M3) par la méthode des cylindres d'agar. La majorité des isolats (63 sur les 88 testés, soit 72%) s'est montrée active contre au moins un champignon-cible (Figure 35).

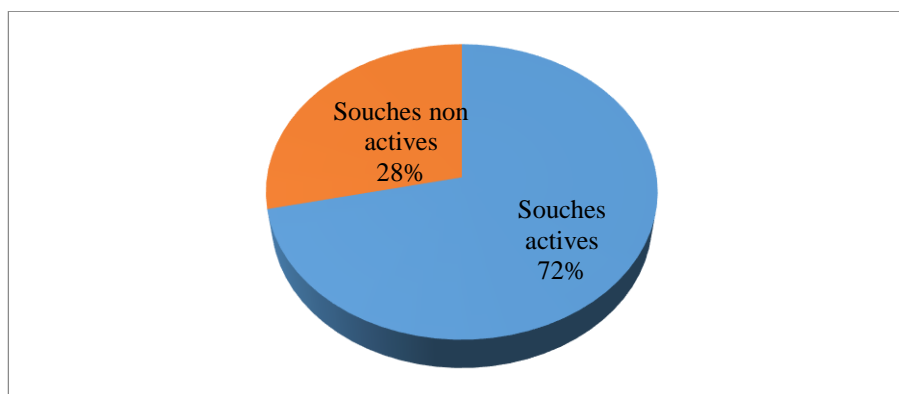


Figure 35. Fréquence des souches actives.

2.2. Spectre d'activité des isolats d'actinobactéries

Le spectre d'activité des isolats d'actinobactéries testées est assez variable. La majorité des isolats possède une activité antifongique spécifique contre un ou deux champignons-cibles. Un nombre très réduit d'isolats d'actinobactéries (cinq isolats uniquement) secrètent des molécules antifongiques à spectre relativement large (activité contre 4 à 5 champignons-cibles) (Figure 36).

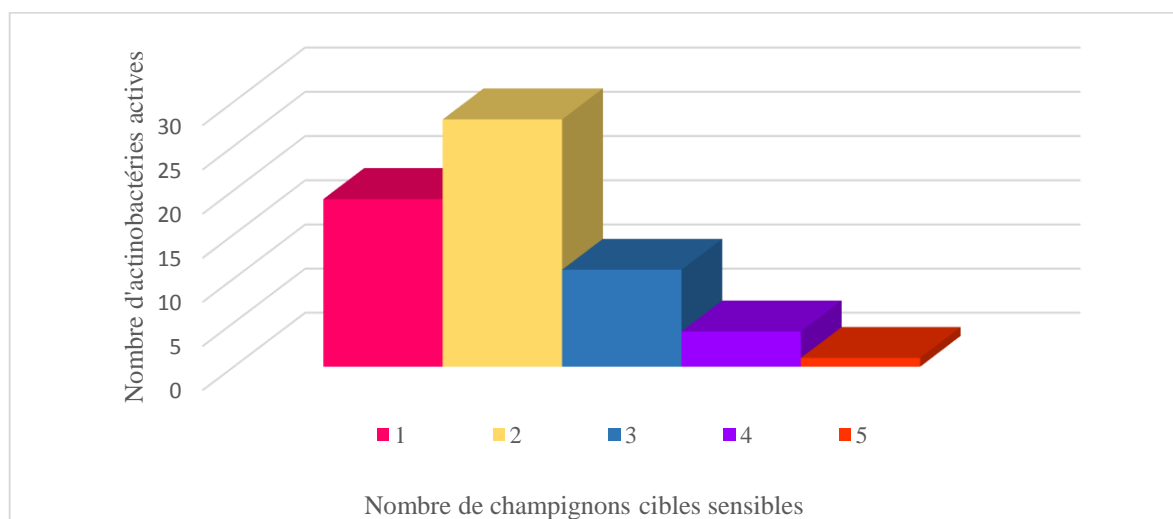


Figure 36. Spectre d'activité des isolats d'actinobactéries.

1 : un champignon cible., 2 : deux champignons cibles., 3 : trois champignons cibles., 4 : quatre champignons cibles., 5 : cinq champignons cibles.

Résultats et discussion

Les activités antifongiques de nos isolats d'actinobactéries sont dirigées en particulier contre *F.culmorum* (sensible aux antifongiques de 40 isolats), *P. chlamydospora* (sensible à 36 isolats) et *A. carbonarius* (sensible à 34 isolats). Cependant, les deux autres champignons-cibles testés (*Phaeoacremonium aleophilum* et *Candida albicans*) sont résistants à l'action des antifongiques de la majorité des isolats d'actinobactéries (Figure 37).

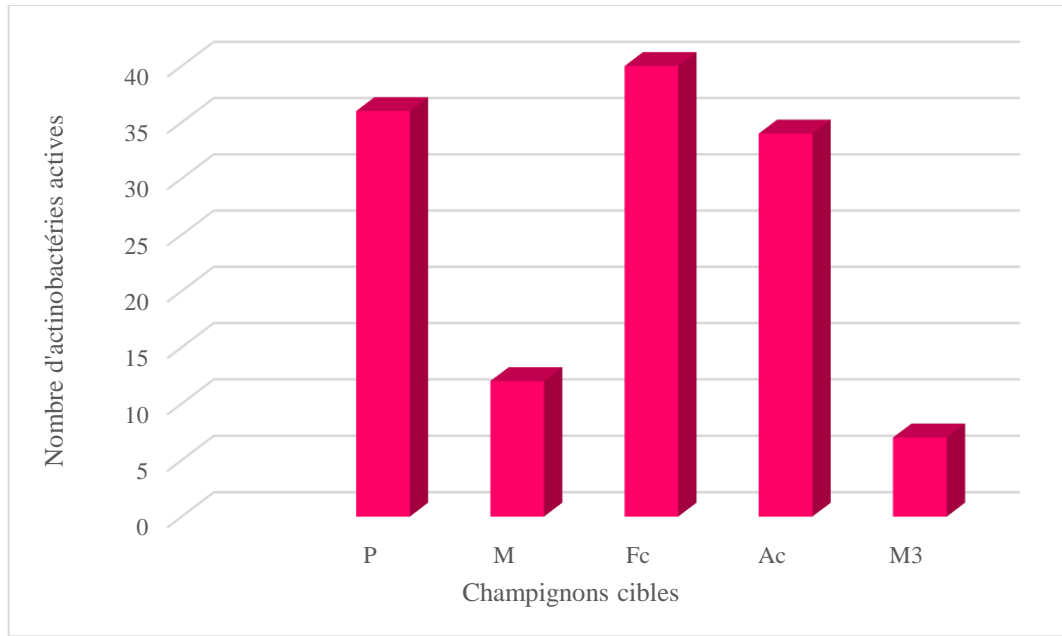


Figure 37. Fréquence de l'activité antifongique des isolats d'actinobactéries en fonction des champignons-cibles.

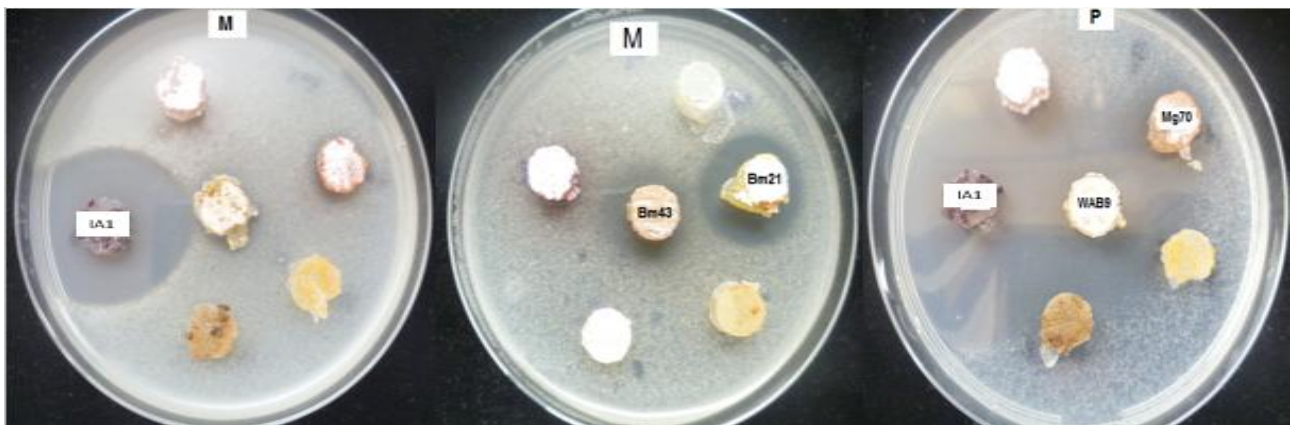


Figure 38. Activité antifongique de quelques souches d'actinobactéries contre les champignons-cibles.

2.3. Potentiel antifongique des genres identifiés

Sur les 63 isolats ayant une activité antifongique, 37 (sur 51) présentent les caractéristiques micromorphologiques du genre *Streptomyces*, 8 (sur 12) du genre *Nocardia*, 7 (sur 12) du genre

Saccharothrix, 5 (sur 6) du genre *Amycolatopsis*, 3 (sur 3) du genre *Actinoplanes*, 2 (sur 2.) du genre *Actinomadura* et 1 (sur 2) du genre *Nocardioopsis* (Figure 39).

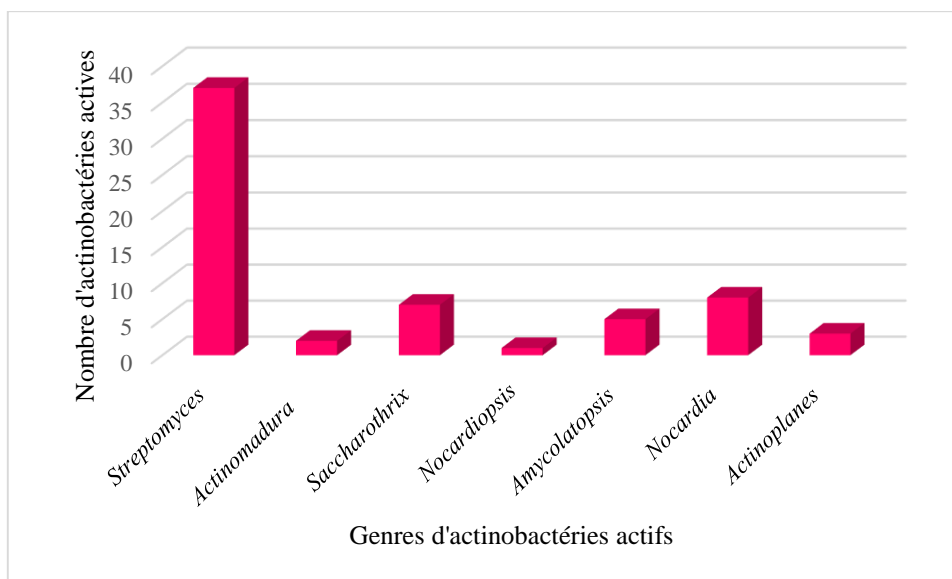


Figure 39. Nombre d'isolats d'actinobactéries actives par genre.

2.3.1. Activité antifongique des isolats de *Streptomyces*

Plus de 72% des isolats rattachés au genre *Streptomyces* ont montré une activité antifongique. Les activités obtenues sont en général moyenne à faible. Parmi les isolats appartenant à ce genre, l'isolat Bm21 est le plus actif avec des diamètres d'inhibition qui oscillent entre 15 et 22 mm. Cependant, les souches IA1 et WAB9 témoins appartenant au genre *Streptomyces* sont sans contexte les plus actives. La souche IA1 est dotée d'une activité très forte contre les 5 champignons-cibles testés (de 30,5 à 50 mm) avec une activité maximale contre *P. chlamydospora*. La souche WAB9 a également montré une forte activité (de 23 à 30 mm) contre les champignons filamenteux, en particulier contre *P. chlamydospora* (Figure 40).

Résultats et discussion

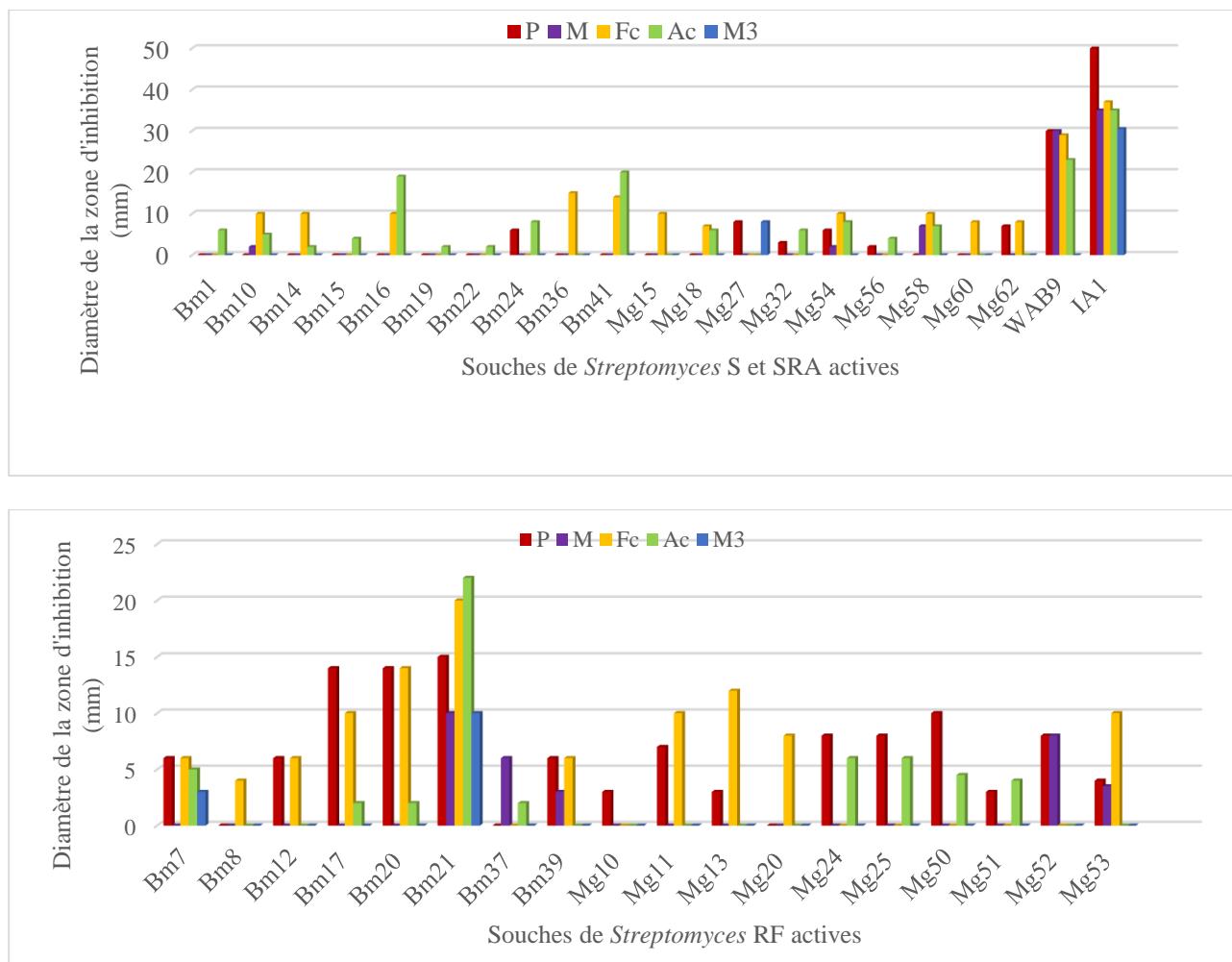


Figure 40. Activité antifongique des souches de *Streptomyces* à chaînes de spores de type S, SRA et RF, contre quelques champignons. Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus. P = *Phaeomoniella chlamydospora*. M = *Phaeoacremonium aleophilum*. Fc = *Fusarium culmorum*. Ac = *Aspergillus carbonarius*. M3 = *Candida albicans*.

S = chaînes de spores de type *Spira* (spirales). SRA = chaîne de spores de type *Spira* et *Retinaculum Apertum* (chaînes de spores spirales, en boucles ou en crochets). RF = *Rectus Flexibilis* (chaînes droites à flexueuses).

2.3.2. Activité antifongique des isolats d'*Actinomadura*

Les isolats Mg63 et Mg66 rattachés au genre *Actinomadura* ont montré une activité antifongique relativement faible. Les activités obtenues sont dirigées contre *F. culmorum* (pour les deux isolats) et *A. carbonarius* (uniquement pour l'isolat Mg63) (Figure 41).

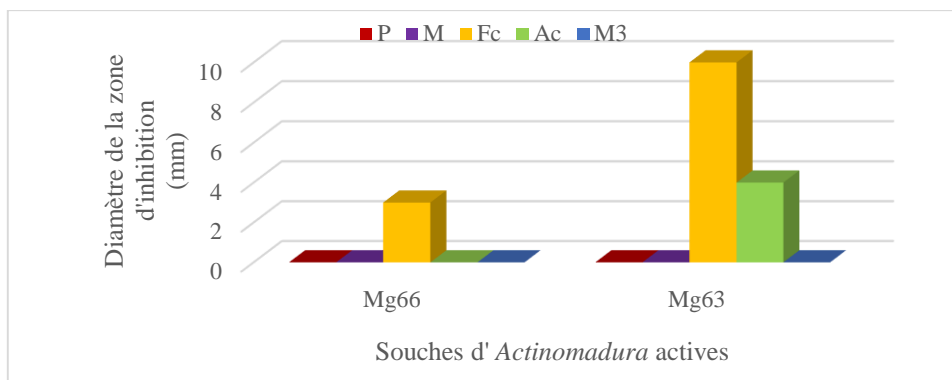


Figure 41. Activité antifongique des souches d'*Actinomadura* contre quelques champignons. Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus.

P = *Phaeoconiella chlamydospora*. M = *Phaeoacremonium aleophilum*. Fc = *Fusarium culmorum*. Ac = *Aspergillus carbonarius*. M3 = *Candida albicans*.

2.3.3. Activité antifongique des isolats de *Saccharothrix*

Sept isolats affiliés au genre *Saccharothrix* ont montré une activité antifongique contre au moins deux champignons-cibles dont *F. culmorum*. La meilleure activité parmi nos isolats a été obtenue pour l'isolat Bm 30 contre *A. carbonarius* avec un diamètre d'inhibition de 20,5 mm. La souche Sa témoin révèle une activité antifongique contre 4 champignons-cibles et atteint un maximum de 27 mm contre *A. carbonarius* (Figure 42).

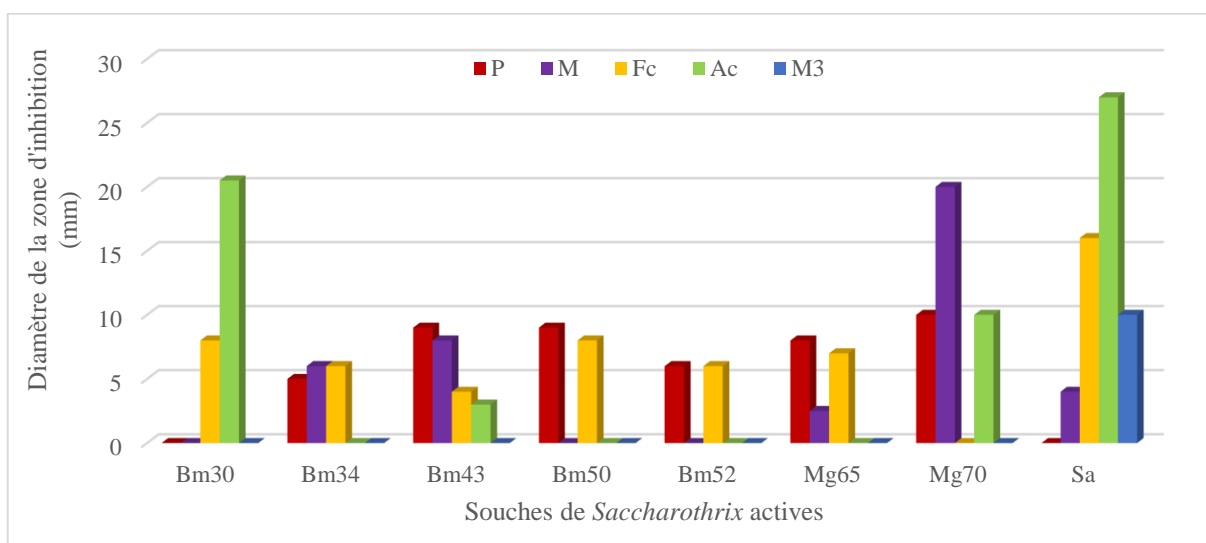


Figure 42. Activité antifongique des souches de *Saccharothrix* contre quelques champignons. Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus.

P = *Phaeoconiella chlamydospora*. M = *Phaeoacremonium aleophilum*. Fc = *Fusarium culmorum*. Ac = *Aspergillus carbonarius*. M3 = *Candida albicans*.

2.3.4. Activité antifongique de l'isolat de *Nocardiosis*

Parmi les deux isolats identifiés comme étant des *Nocardiosis*, seul l'isolat Mg12 a montré une activité antifongique (faible) contre *P. chlamydospora* et *F. culmorum* avec des diamètres d'inhibition de 5 et 12 mm respectivement (Figure 43).

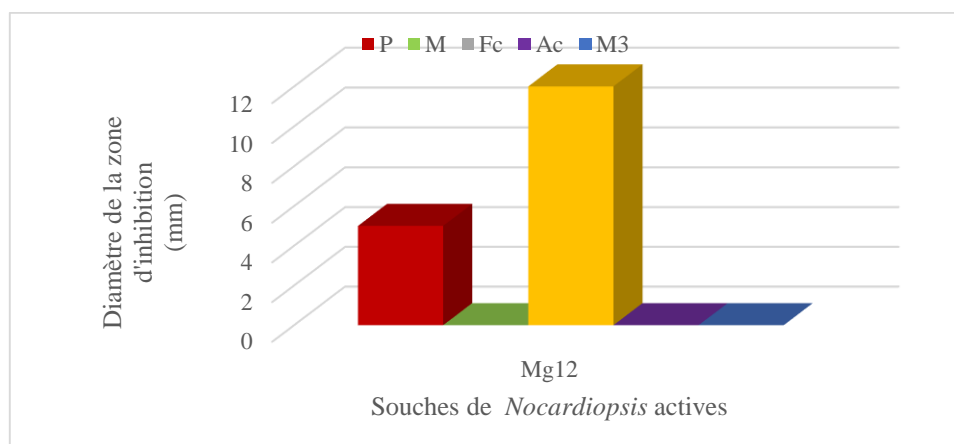


Figure 43. Activité antifongique de la souche Mg12 de *Nocardiosis* contre quelques champignons.

Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus.

P = *Phaeoconiella chlamydospora*. M = *Phaeoacremonium aleophilum*. Fc = *Fusarium culmorum*. Ac = *Aspergillus carbonarius*. M3 = *Candida albicans*.

2.3.5. Activité antifongique des isolats de *Nocardia*

Parmi les douze isolats rattachés au genre *Nocardia*, 8 d'entre eux ont révélé une activité antifongique (relativement faible) contre un à trois champignons-cibles testés. La meilleure activité est celle de l'isolat Mg7 avec un diamètre d'inhibition de 13 mm (Figure 44).

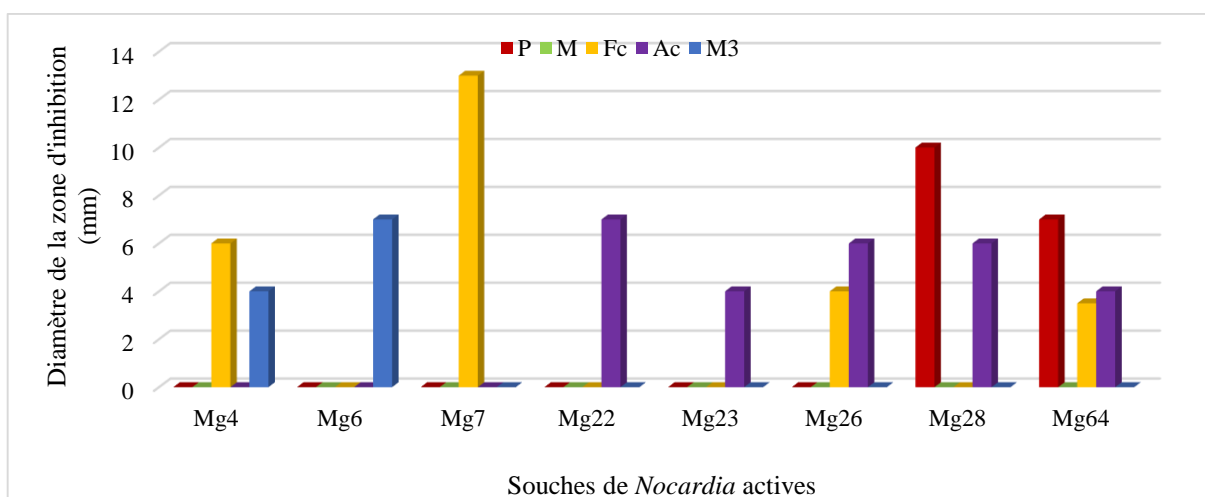


Figure 44. Activité antifongique des souches de *Nocardia* contre quelques champignons.

Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus.

P = *Phaeoconiella chlamydospora*. M = *Phaeoacremonium aleophilum*. Fc = *Fusarium culmorum*. Ac = *Aspergillus carbonarius*. M3 = *Candida albicans*.

2.3.6. Activité antifongique des isolats d'*Amycolatopsis*

L'activité antifongique a été révélée chez 5 isolats affiliés au genre *Amycolatopsis*. L'activité maximale est de 15 mm. Elle a été obtenue pour l'isolat Bm48 contre *F. culmorum*. Une activité spécifique contre *C. albicans* a été enregistrée chez les isolats Bm6 et Mg1 avec des diamètres d'inhibition de 8 et 2,5 mm respectivement (Figure 45).

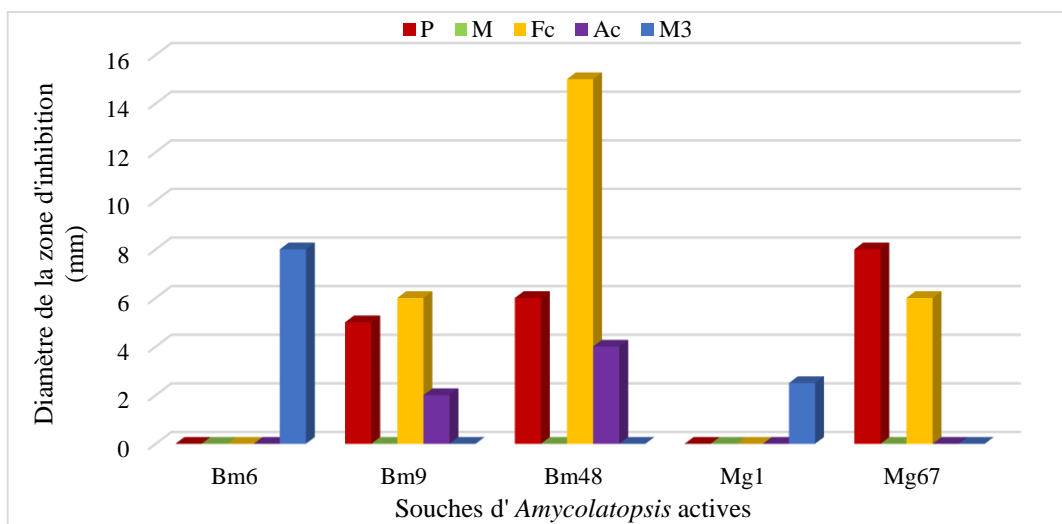


Figure 45. Activité antifongique des souches d'*Amycolatopsis* contre quelques champignons.

Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus.

P = *Phaeoconiella chlamydospora*. M = *Phaeoacremonium aleophilum*. Fc = *Fusarium culmorum*. Ac = *Aspergillus carbonarius*. M3 = *Candida albicans*.

2.3.7. Activité antifongique des isolats d'*Actinoplanes*

Les trois isolats d'*Actinoplanes* sont actifs contre *P. chlamydospora*. Seul l'isolat Bm46 a montré une activité, et uniquement contre *F. culmorum* dont le diamètre d'inhibition est de 25 mm. En revanche, aucune activité n'a été notée contre les trois autres champignons-cibles (Figure 46).

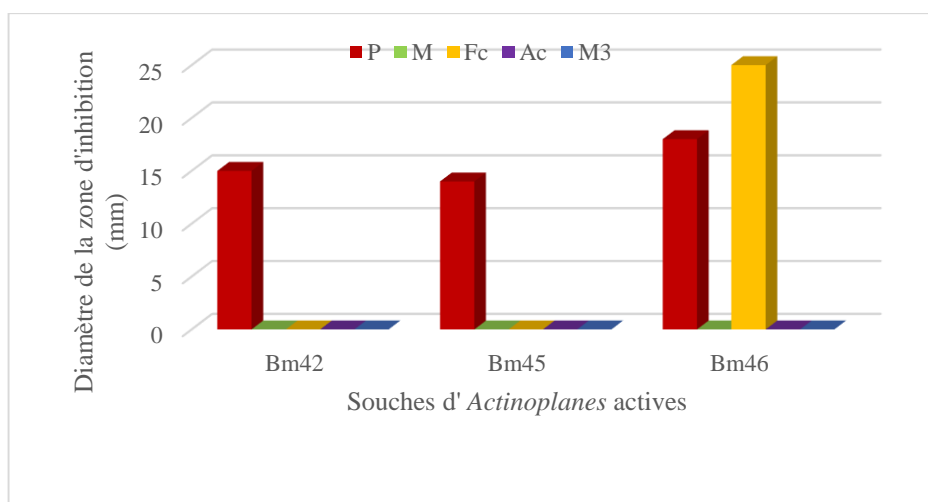


Figure 46. Activité antifongique des isolats d'*Actinoplanes* contre quelques champignons.

Le diamètre des cylindres d'agar n'est pas inclus.

P = *Phaeoconiella chlamydospora*. M = *Phaeoacremonium aleophilum*. Fc = *Fusarium culmorum*. Ac = *Aspergillus carbonarius*. M3 = *Candida albicans*.

2.4. Discussion

Depuis, la découverte de la streptomycine par l'équipe de Waksman en 1943 à partir d'une souche de bactérie du sol appartenant à l'espèce *Streptomyces griseus* et la production de la nystatine, premier antibiotique antifongique, par Hazen et Brown en 1951 à partir de *Streptomyces noursei* provenant aussi du sol, plusieurs recherches ont été entreprises sur des souches d'actinobactéries d'origine terrestre. Différents types de sols (forêts, boue, lac, etc.), même des milieux extrêmes (désert), ont été explorés dans l'espoir de découvrir des souches produisant des produits nouveaux y compris les antibiotiques (Oswald *et al.*, 1968; Hacène *et al.*, 1994; Chiba *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2001; Lee et Hwang, 2002 ; Meklat *et al.*, 2011, Suela Silva, 2013).

Dans ce cadre, un criblage de quatre-vingt-huit souches d'actinobactéries d'origine tellurique a été effectué. L'activité antifongique des souches d'actinobactéries a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Elle se prête bien à la détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux molécules antifongiques produites par les souches d'actinobactéries testées. Elle a été proposée par Cooper et Woodman en 1946 et reprise par Shroder et Messing (1949). Elle consiste à mesurer la diffusion radiale de la molécule bioactive à partir d'un cylindre en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable (Bousbia, 2004).

Soixante-trois souches (72%) parmi les quatre-vingt-huit souches testées, ont montré une activité antifongique contre au moins un des champignons-cibles testés: *Phaeoconiella chlamydospora* (P), *Phaeoacremonium aleophilum* (M), *Aspergillus carbonarius* (AC), *Fusarium*

culmorum (Fc) et *Candida albicans* (M3). Le pourcentage de souches actives obtenu est plus élevé que les pourcentages des souches d'actinobactéries actives isolées à partir de sols sahariens d'Algérie. En effet, Yekkour (2013) a trouvé que sur 146 souches d'actinobactéries isolées de différents écosystèmes du Sahara algérien, seulement 36 souches (24,6%) ont montré une activité antifongique contre plusieurs champignons filamenteux dont *Fusarium culmorum* et *Aspergillus carbonarius* que nous avons utilisés dans notre screening. Toumatia (2015) a constaté que sur 84 souches d'actinobactéries isolées des sols sahariens, seules 24 d'entre elles (soit 28,6%) possèdent une activité antifongique contre plusieurs champignons-cibles.

50,8% des souches actives ont été isolées à partir du milieu chitine-vitamine. Cela concorde avec les résultats de Hoster *et al.*, (2005) qui ont montré que les milieux à base de chitine permettent d'isoler de nombreuses souches d'actinobactéries productrices de composés antifongiques, parfois originaux. Une corrélation élevée entre la chitinolyse et la production de composés bioactifs a été rapportée (Chen *et al.*, 1991; Pisano *et al.*, 1992 in Hoster *et al.*, 2005).

Les souches de *Streptomyces* ont montré une activité antifongique plus importante que celle des souches autres que *Streptomyces*. L'isolat Bm21 appartenant à ce genre se distingue des autres souches par sa très forte activité inhibitrice exprimée sur l'ensemble des champignons-cibles testés. Ces résultats ne sont pas surprenants sachant que les *Streptomyces* sont les plus réputés pour la production d'antibiotiques, y compris les antifongiques (Solecka *et al.*, 2012). Près de 80% des molécules actives d'origine actinobactérienne sont synthétisées par *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Eckwall et Schottel, 1997; Barakate *et al.*, 2002). La souche WAB9 de *Streptomyces* isolée d'un échantillon de sol de Béchara fait l'objet d'un travail de recherche par Yekkour *et al.* (2015) qui a abouti à la découverte d'un nouvel antibiotique antifongique. Une étude réalisée par Toumatia *et al.* (2015) sur la souche IA1 de *Streptomyces* isolée d'un sol de In Amenas a montré de très fortes activités antifongiques et a permis de montrer sa capacité à réduire la maladie tâche chocolat de la fève et la fusariose vasculaire du lin.

Ces dernières décennies, l'importance a été donnée également aux actinobactéries peu fréquentes à rares, tels que *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, etc., qui ont montré un grand potentiel de production de molécules bioactives intéressantes sur le plan médical (Genilloud *et al.*, 2010; Flatt *et al.*, 2013; Nakae *et al.*, 2013). En effet, ces genres peu fréquents à rares sont à l'origine de 25 à 30% des antibiotiques connus. Cependant, les *Streptomyces* spp. sont toujours les producteurs de la majorité des antibiotiques utilisés en thérapeutique (Bérdy, 2005).

Une activité antifongique est retrouvée chez huit isolats de *Saccharothrix*. Cette activité est souvent rapportée dans la littérature. Depuis l'isolement de la première espèce de ce genre, il a été montré qu'il est une source importante de substances actives. A titre d'exemple, *Sa. violacea* LM 036^T et *Sa. albidocapillata* DSM 44073^T sont actives contre les champignons (Lee *et al.*, 2000); *S. algeriensis* SA 233^T que nous avons utilisé comme témoin produit au moins cinq antibiotiques dithiopyrrolones doués d'une activité antibactérienne et antifongique à la fois (Zitouni *et al.*, 2004; Bouras *et al.*, 2006, Merrouche *et al.*, 2010). Plusieurs souches appartenant à ce genre, isolées des sols sahariens algériens ont montré une activité contre plusieurs champignons pathogènes (Zitouni *et al.*, 2004; Bouras *et al.*, 2006). Récemment, Boubetra (2013) et Boubetra *et al.* (2012, 2013, 2015) ont décrit trois nouvelles espèces de *Saccharothrix* nommée *Sa. saharensis*, *Sa. hoggarensis* et *Sa. tamanrassetensis* isolées des sols du Hoggar et qui possèdent des activités antifongiques intéressantes. Les mêmes auteurs ont découvert en 2013 deux nouvelles molécules possédant une activité antifongique, désignées A4 et A5 et produites par *Sa. tamanrassetensis*.

L'activité antifongique a été révélée chez huit isolats appartenant au genre *Nocardia*. Ce genre est exploité comme source de substances actives. De nombreuses espèces de ce genre produisent des antifongiques intéressants dans le contrôle des maladies des plantes, comme c'est le cas par exemple de l'espèce *Nocardia levis* (Kavitha *et al.*, 2010), ou dans l'inhibition des champignons toxigènes comme par exemple *Nocardia brasiliensis* qui produit la brasilinolide B (Mikami *et al.*, 2010).

Trois isolats d'*Actinoplanes* sont dotés d'une activité antifongique. De nombreuses espèces de ce genre produisent des composés bioactifs, notamment des antifongiques, dont certains ont été très utilisés cliniquement, comme ceux produits par *Actinoplanes teichomyceticus*, *A. liguriensis*, *A. capillaceus* et *A. ferrugineus* (Palleroni, 1979 ; Matsumoto *et al.*, 2000; Fukami *et al.*, 2000; Wink *et al.*, 2006).

Deux isolats d'*Actinomadura* sont actifs contre les champignons-cibles testés. Plusieurs espèces de ce genre sont aussi connues pour la production d'antifongiques comme l'a déjà signalé Badji (2006). Ces antifongiques appartiennent aux familles des polyéther, anthracycline et macrolactame. Les souches d'*Actinomadura* isolées du sol saharien algérien sont douées d'une activité importante contre une variété de champignons pathogènes et toxigènes (Badji *et al.*, 2011). Les investigations dans les sols sahariens algériens ont permis de décrire une nouvelle espèce du genre *Actinomadura* nommée *A. algeriensis* (Lahoum *et al.*, 2016a) qui présente une forte activité contre des champignons phytopathogènes et toxigènes, y compris les souches des genres *Aspergillus* et *Fusarium* et d'autres microorganismes pathogènes (Lahoum *et al.*, 2016b). Une

souche d'*Actinomadura* désignée AC170 isolée d'un sol d'Adrar a montré son efficacité dans le contrôle de certaines maladies fongiques des plantes (Meklat et Sabaou. 2008).

Cinq isolats d'*Amycolatopsis* possèdent une activité antifongique. Les espèces de ce genre sont considérées comme étant une source riche d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires, dont des antibiotiques antifongiques cliniquement importants telle que l'octacosamicine produite par *A. azurea* (Dopashi *et al.*, 1988).

Nos résultats montrent que parmi les champignons filamenteux testés, *Fusarium culmorum* est le plus sensible. L'activité anti-Fusarium révèle des zones d'inhibition entre 2 et 37 mm pour 40 souches parmi les 63 isolats actifs (soit 63,5%). Yekkour(2013) a noté que 15 isolats d'actinobactéries ont montré une activité anti-fusarium parmi 34 ayant une activité antifongique. De même, Toumatia *et al.* (2010) ont montré que sur 35 isolats actifs, 20 isolats (soit, 57,1%) sont dotés d'une activité contre *F. culmorum*. En revanche, l'activité contre *Candida albicans* est faible et très rare parmi nos isolats. Sept souches uniquement parmi les 63 actifs (11,1%) ont donné des diamètres d'inhibition entre 3 et 10 mm. D'après les résultats des expériences réalisées par Lemriss *et al.* (2003) par la méthode des cylindres d'agar, parmi les 110 actinobactéries d'origine clinique obtenues par ces auteurs, 42 (soit 38%) sont actives contre *C. albicans* CIP 884.65 avec des diamètres des zones d'inhibition qui varient entre 03 et 52 mm. De même, Slavica *et al.* (2005) ont mentionné que des souches appartenant au genre *Streptomyces* ont montré des zones d'inhibition (11-31mm) vis-à-vis de *C. albicans* ATCC10231. Le pourcentage obtenu est relativement faible par rapport à ceux rapportés par certains auteurs qui ont travaillé sur des souches de *Streptomyces*. Nous pouvons citer les travaux de Saadoun et Moumani (2000) qui ont trouvé 18% (sur 116) de souches actives, les travaux de Alimuddin *et al.* (2011) qui ont trouvé 32% (sur 43) de souches actives et les travaux de Belyagoubi (2014) qui a obtenu 26% (sur 38) de souches actives. Plusieurs études ont également montré une grande variabilité des résultats des tests d'activité antifongique en fonction de la méthodologie (Cadet *et al.* 1996; Kauffman et Carver, 1997; Kang *et al.*, 2010 ; Mendes *et al.*, 2013).

Nous avons remarqué par ailleurs, que l'activité antilevurienne est l'apanage des *Streptomyces*, des *Nocardia*, ainsi que des *Amycolatopsis*, puisqu'aucun des autres genres isolés n'est actif contre ce *Candida albicans*. Ce résultat ne signifie en aucun cas que les autres genres sont inactifs contre les levures. En effet, des travaux antérieurs effectués dans le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'ENS de Kouba, ont montré qu'un grand nombre de souches d'actinobactéries rares ou peu fréquentes, ont présenté des activités antilevuriennes. Nous en citerons quelques-unes de ces souches isolées à partir des sols sahariens appartenant à des genres peu fréquents à rares tels que

Résultats et discussion

Planomonospora, *Planobispora*, *Spirillospora* et *Streptosporangium* (Boudjella *et al.*, 2007) ou *Actinomadura*, *Microtetraspora* et *Herbidospora* (Badji *et al.*, 2011) ou encore *Saccharothrix*, *Microellobosporia*, *Saccharomonospora* et *Thermomonospora* (Zitouni *et al.*, 2005).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les champignons microscopiques sont responsables d'un grand nombre d'affections chez l'homme, les animaux et les végétaux. Ils sont aussi la cause de nombreux dégâts occasionnés aux bois, aux produits agricoles, aux denrées alimentaires et à divers supports.

La recherche de substances antifongiques dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressives pour l'hôte est toujours indispensable. Parmi les nombreuses propriétés des actinobactéries, nous notons leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antifongiques. Ces derniers ont été très étudiés, surtout chez le genre *Streptomyces*, qui est l'actinobactérie dominante dans l'environnement. Le présent travail s'inscrit dans cette dernière optique et a comme objectif de rechercher à partir des sols des actinobactéries productrices de molécules antifongiques, qui permettraient de lutter contre les champignons pathogènes.

A partir des sols prélevés dans deux régions d'Algérie (Boumerdès et Mostaganem), un total de 88 isolats d'actinobactéries a été sélectionné sur les milieux chitine-vitamines B (CH-V) et glycérol-asparagine agar (GAA), additionnés d'agents sélectifs. Près de 58% des isolats présentent les caractéristiques morphologiques des *Streptomyces* et 42% celles de divers autres genres peu fréquents à rares. Le milieu CH-V est plus favorable à l'isolement des genres rares.

Le sol de Mostaganem s'est montré plus riche en actinobactéries du point de vue du nombre d'isolats sélectionnés (54 isolats) et de la diversité des genres (6 genres) par rapport au sol de Boumerdès (34 isolats appartenant à 4 genres).

Le potentiel antifongique des 88 isolats d'actinobactéries a été évalué contre cinq champignons, dont quatre sont phytopathogènes, sur le milieu ISP2 par la technique des cylindres d'agar. Ainsi, 63 isolats ont présenté une activité contre au moins un champignon-cible testé. Les activités antifongiques de nos isolats d'actinobactéries sont dirigées en particulier contre *Fusarium culmorum*. Elles sont obtenues chez tous les genres isolés mais elles sont plus fréquentes et meilleures chez le genre *Streptomyces* auquel appartient la souche Bm21 qui est la plus active.

Cette étude soutient l'opinion que le sol constitue un réservoir important de souches d'actinobactéries, en particulier celles qui appartiennent au genre *Streptomyces*. Ces souches pourraient représenter une source prometteuse d'antibiotiques antifongiques.

Le travail effectué ouvre des perspectives nombreuses et multiples :

Du point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'identifier avec exactitude les souches isolées jusqu'au niveau de l'espèce par les caractéristiques physiologiques, chimiotaxonomiques et moléculaires, notamment l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S et hybridation ADN-ADN.

Du point de vue potentiel antifongique, Il serait nécessaire d'étudier les antifongiques produits par nos meilleures souches en optimisant de la production et en réalisant l'extraction, la purification et la caractérisation spectroscopiques des molécules produites (spectrométrie de masse et spectroscopies UV-visible, infra-rouge et surtout RMN). Il faudrait également faire des tests de toxicité contre diverses cellules animales et/ou végétales.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016).** Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Alapati K., Peddikotla P., Manchala N., Muvva V., Yenamandra V., Karanam V.R. and Venkata B.S. R. (2010).** Isolation, characterization and biological evaluation of bioactive metabolites from *Nocardia levis* MK-VL_113. *Microbiol res.* 165:199-210.
- Amoroso M.W., Croft G.F., Williams D.J., O'Keeffe S., Carrasco M.A., Davis A.R., Roybon L., Oakley D.H., Maniatis T. and Henderson C E. (2013).** Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. *J Neurosci.* 33:574–586.
- Andriole V.T. (2000).** Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. *Int J Antimicro agents.* 16 :317–321.
- Anthony Fisher C., Michael Hanemann W., Michael Roberts J., Wolfram Schlenker.(2012).** The economic Impacts of Climate Change: Evidence from Agricultural Output and Random Fluctuations in Weather: Comment. *Amer econ rev.* 102:3749-60.
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F. and Lebrihi A.(2012).** - *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol producing strain isolated from a Saharan soil. *World. J. Microb.Biot.* 28 (3): 943-951.
- Ara I., Matsumoto A., Abdul Bakir M., Kudo T., Omura S. and Takahashi Y. (2008).** *Actinomadura bangladeshensis* sp. nov. and *Actinomadura chokoriensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1653–1659.
- Athalye M., Lacey J. and Goodfellow M. (1981).** Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *J. Appl. Bacteriol.* 51:289–297. In *bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* (2012). The actinobacteria, Part 4. Genus *Nocardiosis*. Second Edition 5.

Axenov-Gribanov D.V., Voytsekhovskaya I.V., Rebets Y.V., Tokovenko B.T., Penzina T.A., Gornostay T.J., Adelshin R.V., Protasov E.S., Luzhetskyy A.N. and Timofeyev M.A.(2016). Actinobacteria possessing antimicrobial and antioxidant activities isolated from the pollen of scots pine (*Pinussylvestris*) grown on the Baikal shore. *Antonie Leeuwenhoek*. 109: 1307-1307.

B

Badji B.(2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.226 p.

Badji B., Germain P., Le Faou A. et Sabaou N. (2011). Activités antivirales des antibiotiques de deux nouvelles espèces d'actinomycètes isolées des sols sahariens. *Microbiol. hyg. alim.* 23: 23-27.

Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E. and Tillequin F.(2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomurea* sp. NM94. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34 : 403–412.

Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Mathieu F. and Lebrihi A. (2011). Identification of a new strain of *Actinomadura* isolated from Saharan soil and partial characterization of its antifungal compounds. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (63): 13878–13886.

Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K.H. and Beaulieu C.(2002). Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *Wd J Microbiol biotechnol.* 17:49–54.

Belyagoubi L.(2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.143p.

Berdy J. (2005).Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58: 1-26.

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

Berg G., Kurze S., Buchner A., Wellington E.M. and Smalla K.(2000). Successful strategies for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium wilt*. *Can J Microbiol.* 46:1128-1137.

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.(1994).** 9th Eds. Holt J.H., Kreig N.R, Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.(1989).** 8th Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (eds). Vol,4. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology2nd Edition. Volume 4 (2004).** - Taxonomic outline of the procaryotes. Editors: Garrity GM, Bell J. A, Lilburn T. G. Springer-Verlag, New York. 401p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology2nd 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.P.1750 p.
- Bonnet E., Flecher X., Paratt S., Argenson JN., Raoult D. and Fournier PE. (2011).** *Actinomadura meyeriae* osteitis following wound contamination with hay in a woman in France: a case report. J. Medical Case Reports. 5: 32–35.
- Boubetra D, Sabaou N, Zitouni A, Bijani C, Lebrihi A, Mathieu F (2012).** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. Microbiol Res168(4):223–30.
- Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A. and F. Mathieu. (2013c).** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. Microbiol. Res.168 (4): 223-230.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P.and Sabaou N (2013a)***Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. Int J Syst Evol Microbiol63:549–553.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P. and Sabaou N. (2013b)***Saccharothrix saharensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. Int J Syst Evol Microbiol. Doi: 10.1099/ijms.0.051839-0.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P. and Sabaou N. (2015).** - *Saccharothrix tamarrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. Int J Syst Evol Microbiol. 56: 1316-1320.

- Boudjella H. (2007).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, Institut National Agronomique El-Harrach.188p.
- Boudjella H. (1994).** Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger.177p.
- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A.(2006).**Nutritional requirements for the production of dithiolo-pyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enz. Microbiol. Tech.* 39:1423–1429.
- Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Schumann P., Spröer C., Sabaou N and Klenk H.P. (2015).***Nocardioopsis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie Leeuwenhoek*, 107:313–320.
- Bousbia N. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique, Alger (Algérie).
- Bouznada K., Bouras N., Mokrane S., Chaabane Chaouch F., Zitouni A., Pötter G., Spröer C., Klenk H P. and Sabaou N. (2016).***Saccharothrix isguenensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Saharan soil. *J Syst Evol Microbiol.*66: 4785-4790.
- Bouznada K., Bouras N., Mokrane S., Chaabane Chaouch F. and Zitouni A. (2017).***Saccharothrix ghardaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Antonie Leeuwenhoek.*110: 399–405.
- Bredholt H., Fjaervik E., Johnsen G. and Zotchev S.B. (2008).** Actinomycetes from sediments in the Trondheim Fjord, Norway: diversity and biological activity. *Marine drugs* 6:12-24.
- Biswas D.S.K and Mukherjee.S.K. (2001).***Textbook of Soil Sciences.*Tata McGraw-Hill Education.66p.

Références bibliographiques

- Brent K.J. (1984).** Fungal diseases of plants and the effectiveness of present methods of control. In: Mode of action of antifungal agents. (Trinci, A.P.J. and Ryley, J.F., Eds). Cambridge University Press. 1-15p.
- Breton A. (1990).** Moisissures nuisibles. In: « Moisissures utiles et nuisibles: Importance industrielle » (Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. Eds). Masson Paris.210-225p.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J. and Vobi G. (1989).** Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In : Biotechnologie des antibiotiques. Larpent, J.P. and Sanglier, J.J. Paris, Masson. 33–70p.
- Brown-Elliott B.A., Brown J.M., Conville P.S. and Wallace R.J.(2006).** Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. Clin Microbiol. Rev. 19(2):259-282.

C

- Cadet D.E., Fontenay G., Laveille B., Linas M.D. and Segula, J.P. (1996).** Comparaison statistique de deux méthodes d'évaluation de l'activité antifongique. J Mycol Méd, 6 (3):129–132.
- Cargill J.S., Boyd G.J. and Weightman N.C. (2010).** *Nocardia cyriacigeorgica*: a case of endocarditis with disseminated soft-tissue infection. J. Med. Microbiol. 59: 224–230.
- Chandra G., ChaterK.F. (2014).**Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. FEMS Microbiol Rev 38 (3): 345-379.
- Chandracant R.K. (2008).**Pharmaceutical Microbiology Principles and Applications. Nirali Prakashan. 12p.
- 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. J. Biosci. Bioeng. 111: 501-511.

Références bibliographiques

- Chargaff E. (1950).** Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*. 6:201 -209.
- Chen M.F., Shimada F., Kato H., Yano S. and Kanaoka M.(1991).**Effect of oral administration of glycyrrhizin on the pharmacokinetics of prednisolone. *Endocrinol Jpn*. 38(2):167-74.
- Chiba H., Agematu H., Kaneto R., Terasawa T., Sakai K., Dobachi K and Yoshioka T. (1999).** Rhodopeptins (Mer-N1033), novel cyclic tetrapeptides with antifungal activity from *Rhodococcus sp.*: Part 1. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiotics*.52(8):695-699.
- Cohen Y. et Jacquot C. (2008).** Pharmacologie, Eds Masson. 512p.
- Colombié V.(2005).** Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. 174p.
- Conn V.M., 2005.** Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University.297p.
- Cooper K.E. and Woodman D. (1946).** The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *J. Path. Bact.* 58: 75.
- Couraud S., Houot R., Coudurier M., Ravel A.C., Coiffier B., Souquet P.J.(2007).** Infections pulmonaires à *Nocardia*. *Rev. Mal. Respir.* 24: 353-357.

D

- 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. *International journal of food microbiology*103: 271–284.

Références bibliographiques

Dinya Z.M. and Sztaricskai F.J. (1986). Ultraviolet and light absorption spectrometry. *In:* Modern analysis of antibiotics. Aszalos A. Marcel Dekker, New York. 19-96p.

Dommergues Y. and Mangenot F. (1970). Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie Paris.

Doumbou C.L., Salove M.K., Crawford D.L. and Beaulieu C. (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*. 82: 85-102.

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

E

Eckwall E.C. and Schottel J.L. (1997). Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19:220-225.

El-Shanshoury A.R., Abu El-Sououd S.M., Awadella O.A. and El-Bandy N.B. (1996). Effect of *Streptomyces corchorusii*, *Streptomyces mutabilis*, Pendimethalin and Metricuzin on the control of bacterial and *Fusarium* wilt of tomato. *Can.J.Bot.* 74:1016-1022.

Errakhi R., Bouteau F., Lebrihi A. and Barakate M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbio. and Biotech.* 23(11): 1503-1509.

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 Biology and Biochemistry*. 34:1–16.

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 *Pythiumaphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. *Eur J Plant Pathol*. 128: 527-539.

Références bibliographiques

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.

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

Euzéby J.P. (2015). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>.

F

FAO. (2008). Rapport de la troisième session de la Commission intérimaire des mesures. www.fao.org/.

Flatt P.M., Wu X., Perry S. and Mahmud T.(2013). Genetic insights into pyralomicin biosynthesis in *Nonomuraea spiralis* IMC A-0156. J Nat Prod. 76:939–946.

Fukami A., Nakamura T., Kawaguchi K., Rho M.C., Matsumoto A., Takahashi Y., Shiomi K., Hayashi M., Komiyama K. and Omura S. (2000).A new antimicrobial antibiotic from *Actinoplanes capillaceus* sp. K95-5561T . J Antibiot (Tokyo) 53:1212-1214.

G

Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J and Vicente F. (2010) .Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. J Ind Microbiol Biotechnol DOI10.1007/s10295-010-0882-7.

Genilloud O., Gonzàlez I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R. and Vicente F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products.J. Ind Micobiol Biotechnol.38: 375-389.

- George .M, Cyriac N., Nair A. and Hatha A.A.M. (2010).** Diversity of Bacillus and Actinomycetes in the water and sediment samples from kumarakom region Vembanadu lake. Indian journal of Geo-marine sciences. 430-437p.
- Georgopapadakou N.H. and Walsh T.J. (1994).** Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. Sci. 264: 371-373.
- Ghannoum M.A. and Rice B.L. (1999).** Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance, clin microbiol rev. 501-517p.
- Giddings L.A. and Newman D.J. (2014).** Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles, Springer. 90p.
- González I., Ayuso-Sacido A., Anderson A. and Genilloud O. (2005).** Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiology Ecology. 54: 401–415.
- Goodfellow M. (2012).** - Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria (2^{ème} Eds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 2083 p.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 37: 189-216.
- Goshi K., Uchida T., Lezhava L., Yamasaki M., Hiratsu K., Shinkawa H. and Kinashi, H. (2002).** Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. Journal of Bacteriology. 184: 3411-3415.
- Groll A.H., Sein T., Petraitis V., Petraitiene R., Callender D., Gonzalez C.E., Giri N., Bacher J., Piscitelli S. and Walsh T.J. (1998).** Compartmental pharmacokinetics and tissue drug distribution of the pradimicin derivative BMS 181184 in Rabbits. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42:2700–2705.
- Gupte M., Kulkarni P. and Ganguli B.N. (2002).** Antifungal antibiotics. Appl Microbiol. Biotechnol. 58: 46-57.

Gyobu Y. and Miyadoh S. (2001). Proposal to transfer *Actinomadura carminata* to a new subspecies of the genus *Nonomuraea* as *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 881–889.

H

Hacène H., Sabaou N., Bounaga N and Lefevre G. (1994). Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare actinomycetales. *Microbios*, 79(319): 81–5.

Hagedorn C. (1976). Influence of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl Environ Microbiol.*32:368–375.

Hamaki T., Suzuki M., Fudou R., Jojima Y., Kajiura T., Tabuchi A., Sen K. and Shibai H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng.* 99: 485-492.

Hazen E.L. and Brown R. (1951). Fungicidin, an antibiotic produced by soil actino mycete. *Proc Soc Exp Bio Med*, 76(1): 93-97.

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.

Hayakawa M. and Nonomura H. (1984). HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. *Annual Meeting of the Actinomycetologists, Osaka, Japan.*6p.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T.(1994).Bergey's manual of determinative bacteriology. *Williams and wilkins baltimore.*9:2340-2343.

Hoster F., Schmitz J.E. and Daniel R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66 : 434-442.

Références bibliographiques

Hozzein W.N. and Goodfellow M.(2008). *Nocardiopsis arabiasp.* nov., a halotolerant actinomycete isolated from a sand-dune soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2520–2524.

Hütter R. (1967). Systematik der Streptomyceten. *Bibl. Microbiol. Fasc.* 6p.

Hwang B.K., Lim S.W., Kim J.Y., Lee J.Y and Moon S.S. (2001). Isolation and in vivo and invitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl Environ Microbiol.* 67(8): 3739–3745.

J

James Anderson B. (2005). Evolution of antifungal drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat rev microbial.* 3:547-556.

Jiang Y., Chen X., Lou K. and Mao P.(2012). Cultivable soil actinomycete communities in some areas of western China. *Academia Journal of Biotechnology* 1(1): 001-013.

Jihani S., Brodolin K., Iraqui M., Ibsouda S. and Haggoud A. (2012). Isolation and molecular identification of antibiotic-producing actinomycetes from an old house in the medina of Fez, Morocco. *Afr J Microbiol Res.* 6(47):7370-7376.

K

Kaewkla O. and Franco C. M. M. (2010). *Nocardia callitridis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized root of an Australian native pine tree. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60 (7): 1532-1536.

Kageyama A., Torikoe K., Iwamoto M., Masuyama J I., Shibuya Y., Okazaki H., Yazawa K., Minota S., Kroppenstedt R. M. and Mikami Y. (2004). *Nocardia arthritidis* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 42(6): 2366–2371.

Références bibliographiques

- Kang M.J., Strap J.L. and Crawford D.L. (2010).** Isolation and characterization of potent antifungal strains of the *Streptomyces violaceusniger* clade active against *Candida albicans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37(1): 35-41.
- Karthik L., Kumar G. and Rao K.V.B. (2013).** Antioxidant activity of newly discovered lineage of marine actinobacteria. *Asian Pac J Trop Med*. 6: 325-332.
- Katsifas E.A., Giannoutsou E.P. and Karagouni A.D.(1999).** Diversity of streptomycetes among specific greek terrestrial ecosystems. *Lett. Appl. Microbiol*. 29: 48–51.
- Kauffman C.A and Carver R.L. (1997).** Antifungal agents in the 1990s: Current status and future developpements. *Dru*.53(4): 539–549.
- Kettani A., Belkhadir Z.H., Mosadik A., Faroudy M., AbabouA., LazreqC., et Sbihi A.(2006).** Antifungal treatment of systemic candidosis in intensive care unit. *J Mycol Med*. 16 (1): 16–25.
- Khamna S., Yokot 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.
- Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F. and Lumyong S. (2010).** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Eur Asia J BioSci*.4: 23-32.
- Khanna M., Solanki1 R. and Lal R. (2011).** Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int J Adv Biotechnol Res ISSN 0976-2612*.2: 357-375.
- 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 (2): 346-351.
- Klenk H P and Sabaou N. (2016).** *Saccharothrix isguenensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66: 4785-4790.

- Kohanski M.A., Dwyer D.J. and Collins J.J.(2010).** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat rev.*8 :432-435.
- Koltin Y. and Hitchcock C.A. (1997).** The search for new triazole antifungal agents. *Curr Opin In Chem Biol.* 1:176–182.
- Kuang W., Li J., Zhang S. and Long L. (2015).** Diversity and distribution of Actinobacteria associated with reef coral *Porite lutea*. *Front. Microbiol.*6: 1-13.
- Kurtböke D İ. (2012).** Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93:1843–1852.
- Kumar A., Bohra C. And Singh.L.K. (2003).**Environment, Pollution and Management, APH Publishing. 532-533p.

L

- Lahdenperä, M.L., Simon, E. and Uoti, J. (1991).** Mycostop - a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria. In: Beemster ABR, Bollen GJ, Gerlagh M, Ruissen MA, Schippers B, Tempel A (eds). *Biotic interactions and soil-borne disease*. Amsterdam: Elsevier. 258–263p.
- Lahoum A., Bouras N., Bouznada K., Holtz M. D., Spröer C., Klenk H-P. and Sabaou N. (2015).***Saccharothrix* sp. ABH26, a new actinobacterial strain from Algerian Saharan soil: isolation, identification and antimicrobial activity. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 4: 415-420.
- Lahoum A., Bouras N., Mathieu F., Schumann P., Spröer C., Klenk H P and Sabaou N. (2016a).** *Actinomadura algeriensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Antonie Leeuwenhoek.* 109: 159–165.
- Lahoum A., Aouiche A., Bouras N., Verheecke C., Klenk H.P., Sabaou N., Mathieu F. (2016).** Antifungal activity of a Saharan strain of *Actinomadura* sp. ACD1 against toxigenic fungi and other pathogenic microorganisms. *J Mycol Med.* 26(3):193-200.

- Lahoum A., Bouras N., Verheecke C., Mathieu F., Schumann P., Spröer C., Klenk HP and Sabaou N. (2016b).** *Actinomadura adrarensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66: 2724–2729.
- Lai C.C., Tan C.K., Lin S.H., Liao C.H., Chou C.H., Hsu H.L., Huang Y.T. and Hsueh P.R. (2009).** Comparative in vitro activities of nemonoxacin, doripenem, tigecycline and 16 other antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides* and unusual *Nocardia* species. *J. Anti. Chemo.* 64 :73-78.
- Laskin I.A., Bennett J.W., Gadd G.M. and Gulf S.S. (2005).** *Advances in Applied Microbiology*, Ed: Gulf Professional Publishing, Houston, Texas, États-Unis. 58: 279.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2001)** - Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Leeuwenhoek.* 78:399-405.
- Labeda D.P., Goodfellow M., Brown R., Ward A.C., Lanoot B., Vannanneyt M., Swings J and Kim S.B. (2012).** Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie Leeuwenhoek.* 101(1):73–104.
- 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., Testa R.T., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1984).** *Saccharothrix*: a New Genus of the *Actinomycetales* Related to *Nocardiopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34(4): 426–431. Labeda D.P. and Lyons A.J. 1989. *Saccharothrix texasensis* sp. nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39(3): 355–358.
- Lechevalier M.P. (1972).** Description of a new species, *Oerskovia xanthineolytica* and emendation of *Oerskovia* Prauser. *Int J Syst Bacteriol.* 2: 260–264.
- Lee S.D., Kim E.S., Roe J.H., Kim J.-H., Kang S.O. and Hah Y.C. (2000).** *Saccharothrix violaceasp.* nov., isolated from a gold mine cave, and *Saccharothrix albidocapillata* comb.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1315–1323.
- Lee J.Y., Hwang B.K. (2002).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol.* 48(5): 407–417.

Références bibliographiques

- Lee S.D. (2012).** *Actinomadura rupiterrae* sp. nov., isolated from cliff soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62: 990–995.
- Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J M., Saintpierre-Bonaccio D., Rifai S., Fassouane A and Boiron P. (2003).** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol.* 49(11): 669-674.
- Lien Callewaert, Joris Van Herreweghe M., Lise Vanderkelen, Seppe Leysen, Arnout Voet and Chris Michiels W. (2012).** Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors. *Trend Microbiol.* 20:501-510.
- Lu Z., Wang L., Zhang Y., Shi Y., Liu Z., Quintana E.T. and Goodfellow M. (2003).** *Actinomadura catellatispora* sp. nov. and *Actinomadura glauciflava* sp. nov., from a sewage ditch and soil in southern China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 137–142.
- Locci R. (1994).** Actinomycetes as plant pathogens. *Eur J Plant Pathol.* 100: 179-200.
- Lohner K. (2014).** A sponge against fungal infections, nature chemical biology. *Nat Amer, Inc.* 10:411-412.
- Loqman S. (2009).** La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de Doctorat en Biologie et Physiologie Végétale. Université de Reims Champagne-Ardenne. France. 216p.

M

- Matsumoto T., Yamaguchi H., Hamura T., Tanabe M., Kuriyama Y and Suzuki K.(2000).** Synthetic study of aquayamycin. Part 1: synthesis of 3- (phenylsulfonyl)phthalides possessing a b-C-olivose. *Tetrahedron Lett.* 41:8383-7.
- Makhijani K. (2008).** *Textbook of Environmental Microbiology.* I. K. International Pvt Ltd. 30p.

Références bibliographiques

- Martin J.F. (1979).** Polyene macrolide antibiotics. *In: Economic Microbiology.* Rose A.H. (Ed.). Academic Press London. 3: 355-387.
- Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Sprer C., Klenk H.P. and Sabaou N. (2012).** *Actinopolyspora algeriensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil. *Extremophiles.* 16:771–776.
- Meklat A and Sabaou N. (2008).** Use of *Actinomadura* AC 170 antibiotics in the treatment of some cultivated plant diseases. *Egyptian Journal of Biological Pest Control.* 18 : 33-137
- Meklat A., Sabaou N., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Spröer C and Klenk H P (2012).** A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil. *Ann Microbiol* 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. *App environ microbiol.* 77 : 6710–6714.
- Mendes T.D., Borges W.S., Rodrigues A., Solomon S.E., Vieira P.C., Duarte, M.C and Pagnocca F.C. (2013).** Anti-*Candida* properties of urauchimycins from *Actinobacteria* associated with *trachymyrmex* ants. *Biomed Res Int.* 835081.: 9.
- Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A. (2010).** Dithiolopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Prod.* 73 :1164–1166.
- Meyer J., (1976).** *Nocardiopsis*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J Syst Bacteriol.* 26(4) : 487–493.
- Mikami A.Y., Lerner M.D and Lun J. (2010).** Social context influences on children's rejection by their peers. *Child Development Perspectives.* 4 :123–130.
- Minuto A., Spadaro D., Garibaldi A. and Gullino M. L. (2006).** - Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Prot.* 25:468–475.

Références bibliographiques

Miyadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J. and Hotta K. (2002). "Digital Atlas of Actinomycetes". (<http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas>). The Society of Actinomycetes. Tokyo Japan.

Mohammadipanah F. and Wink J. (2016). Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. *Front. Microbiol.* 6: 1541.

N

Nafis A., Azmani A., Oubaha B., Hassani L., Niedermeyer T. et Barakate M. (2016). Extraction et purification des antifongiques non polyéniques de la souche *Streptomyces* sp. Z26 isolée des écosystèmes Marocains. *J Mycol Méd/J of Med Mycol.* 26 (2): 113–114.

Nakae K., Kurata I., Kojima F., Igarashi M., Hatano M. et Sawa R. (2013) Sacchathridine, A, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix* sp. *J Nat Prod* 76:720–722.

Nalubega F. (2016). Caractérisation polyphasique et potentiel antagoniste de quelques souches d'actinobactéries. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master. 31p.

O

Odds F.C., Brown A.J.P. and Gow N.A.R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trend Microbiol.* 11:272–279.

Oswald, E.T., Ferchau, H.A. (1968). Bacterial associations of coniferous mycorrhizae. *Plant Soil.* 28:187–192.

Orth G. et Guénet J.L. (2003). The scientific achievements of Edmond Nocard (1850-1903). *Bull.soc.fr.hist.méd.sci.vét.* 100-110p.

P

- Palleroni, N. J. (1979).** New species of the genus *Actinoplanes*, *Actinoplanes ferrugineus*, *Int J syst bacteriol.* **29** : 51-59.
- Pathom-aree W., Stach J., Ward A., Horikoshi K., Bull A. and Goodfellow M. (2006).** Diversity of actinomycetes isolated from challenger deep sediment (10,898m) from the Mariana Trench. *Extre.* **10**:181-189.
- Paul V. Woolley, Kenneth D. Tew. (2017).** Mechanisms of Drug Resistance in Neoplastic Cells: Bristol-Myers Cancer Symposia. Elsevier. **9**:416.
- Pebret F. (2003).** Maladies infectieuses: toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales. Heures de France. 592p.
- Peltola J.S.P., Anderson M.A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R.M., Busse H.J., Salkinoja-Salonen M.S. and Rainey F.A. (2001).** Isolation of toxigenic *Nocardiosis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardiosis* species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischholae* sp. nov. *Appl and Environ Microbiol.* **67**:4293–4304.
- Perry J.J., Staley J.T. and Lory S. (2004).** Microbiologie, cours et questions de révision. Dunod. Paris. 497-850p.
- Pisano M.A., Sommer M.J. and Tars L. (1992).** Bioactivity of chitinolytic actinomycetes from marine origin. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**:553–555. *In* Hoster F., Schmitz J.E. and Daniel R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* **66**: 434-442.
- Pithakkit S., Petcharat V., Chuenchit S., Pornsuriya C. and Sunpapao A. (2015).** Isolation of antagonistic actinomycetes species from rhizosphere as effective biocontrol against oil palm fungal diseases. *Walailak J Sci Tech.* **12**:481-490.

Références bibliographiques

Puhl A.A., Selinger L.B., McAllister T.A. and Inglis G.D. (2009). *Actinomadura keratinilytica* sp. nov., a keratin degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. Int. J. Syst Evol Microbiol. 59:828–834.

Q

Qin S., Zhao G.Z., Klenk H.P., Li J., Zhu W.Y., Xu L.H. and Li W.J.(2009). *Nonomuraea antimicrobica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a leaf of *Maytenus austroyunnanensis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2747–2751.

Qin S., Li J., Chen H.H., Zhao G.Z., Zhu W.Y., Jiang C.L., Xu L.H., Li W.J. (2009).

Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in xishuangbanna, China. Appl Environ Microbiol. 75:6176–6186.

Qin S., Li W.J., Dastager S.G., Hozzein W.N. Frontiers Media SA. (2016). Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity. Function Roles and Environmental Adaptations. Front Microbiol. 62p.

R

Raper K. et Fennell D.J. (1965). The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.

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

Rocha O., Ansari K. and Doohan F.M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. Food Add Cont22: 369–378.

Rudramurthy S.M., Sumangala B., Honnavar P., Madhav Y.B., Munegowda K.C., Ravi D. and Chakrabarti A.(2012). Nasal vestibulitis due to *Nocardiosis dassonvillei* in a diabetic patient. *J. Med. Microbiol.* 61:1168–1173.

S

Saadoun L., Moumani A.I.F. (2000). *Streptomyces* from Jordan soils active against *Agrobacterium tumefaciens*. *Actinomycetes*, 8(1-2) : 29–36.

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. sources d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*.9: 147-153.

Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. et Bounaga N. (1992). Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can J Microbiol.* **38**: 1066-1073.

Saravanamuthu R. (2010). *Industrial Exploitation of Microorganisms*, I. K. International Pvt Ltd.304p.

Segal E. (2005). *Candida*, still number one—what do we know and where are we going from there?. *Mycoses* 48(1):3–11.

Serge K. (2010). *Guide de chimie médicinale et médicaments*.Lavoisier.900p.

Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16: 3313-3340.

Shivlata L. and Satyanarayana T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic *Actinobacteria*: biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6: 1-29.

Schroeder M.P. Messing A.M. (1949). Methods for comparing the antibacterial activity of essential oils and other aqueous insoluble compounds. *Bull. Nat. Formulary Comm.* 17: 213–218.

Références bibliographiques

- Slavica B.I., Sandra S.K., Zoran B.T. (2005).** Uv/Vis analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Med Biol.* 12(1): 44–46.
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz M. (2012).** - Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.* 373-390p.
- Soraa N., Arsalane L., Ouhdouch Y. et Louzi L.(2009).** Abces cerebral à *Nocardia*: a propos d'un cas. *Rev. Tun. Infectiol.* 3(2): 29–33.
- Stackebrandt E. and Schumann P. (2006).** - Introduction to the taxonomy of *Actinobacteria*. *Prokaryotes.* 3:297-321.
- Subramani R. and Aalbersberg W. (2013).** Culturable rare Actinomycetes : diversity, isolation and marine natural product discovery .*Appl Microbiol Biotechnol.* 97:9291–9321.
- Subramaniam G., Arumugam S., and Rajendran V. (2016).** Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes. Springer. 84p.
- Suela Silva M., Naves Sales A., Teixeira Magalhães-Guedes K., Ribeiro Dias D., Schwan RF. (2013).** Brazilian Cerrado soil Actinobacteria ecology. *Biomed Res Int.* 503-805p.
- Sujata V. Bhat, B.A. Nagasampagi, Meenakshi Sivakumar, (2005).** **Chemistry of Natural Products. Springer Science & Business Media. 840p.**
- Sullivan D.C. and Chapman S.W.(2010).** Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis and nocardiosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.*7: 216–221.

T

- Tadijan I., Grahovac J., Dodi J.C., Grahovac M., Masirevic2D S. Vucurovic. and Dodic S. (2014).** Effect of carbon sources on the production of the biofungicide by *Streptomyces hygroscopicus*. *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria.* 7 :54–62.

- Tamura T., Zhiheng L., Yamei Z. and Hanato K. (2000).** Actinoalloteichus cyanogriseus gen. nov. sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:2310.
- Theilleux J. (1994).** Les actinomycètes. In: Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel. (Leveau, J.Y. and Bouix, M., Eds). Collection Sciences et Techniques agro-alimentaires.
- Tiwari K. and Gupta R K. (2011).** Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel Antibiotics. Crit Rev Biotechnol.32:108-132.
- Toumatia O. (2015),** Etude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. thèse de doctorat. Ecole normale supérieure de kouba-alger. 60 p.
- Toumatia O., Yekkour A., Goudjal Y., Riba A., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Zitouni A. (2015).** Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. J Basic Microbiol. .55(2):221-8.
- Toumatia O., Zitouni A., Meklat A, Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N. (2010).** Effet d'une souche saharienne de *Streptomyces mutabilis* et de son antibiotique sur les maladies « Tache chocolat » de la fève et la fusariose vasculaire du Lin. « Journées Actinomycètes 2010 », les 27 et 28 mai, Institut Pasteur, Paris France. Communication affichée.
- Tseng M., Yang S.F. and Yuan G.F. (2010).** *Herbidospora yilanensis* sp. nov. and *Herbidospora daliensis* sp. nov., from sediment. Int J Syst Evol Microbiol., 60 (5): 1168-1172.
-
- w
-

Walsh C. (2003). Where will new antibiotics come from?. *Nat Rev Microbiol.* 1(1):65–70.

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

Références bibliographiques

- H.G. (1987).** - Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* 37: 463-464.
- Waksman S.A. and Henrici A.T. (1943).** The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol.* 46 :337-341.
- Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W. and Suzuki K.I. (2012).** *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Actinobacteria, Part A. 5, 2nd edition, Springer New York, Dordrecht Heidelberg London.*
- Williams S.T., Goodfellow M., Wellington E.M.H., Vickers J.C., Alderson G., Sneath P.H A. and Sackin M.J. (1983).** A probability matrix for identification of some Streptomyces. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1815-1830.
- Williams S.T., Lanning S., and Wellington E.M.H. (1984).** Ecology of *Actinomycetales*. 481–528p. In: *The Biology of the Actinomycetes.* (Goodfellow, M., Mordarski, M. and Williams, S.T., Eds). Academic Press, London.
- Wink M.(2006).** *An Introduction to Molecular Biotechnology.-Molecular fundamentals, methods and applications in modern biotechnology.* Wiley-VCH, 768 Seiten.
- Wink J.M., Kroppenstedt P.M., Schumann P., Seibert G. and Stackebrandt E. (2006).** *Actinoplanes liguriensis* sp. nov. and *Actinoplanes teichomyceticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2125–2130.
- Woo J.H., Kitamura E., Myouga H. and Kamei Y. (2002).** An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red disease in *Porphyra* spp. *Appl. Env. Microbiol.* 68(6): 2666–2675.
-
- X
-
- Xiao J., Wang Y., Luo Y., Xie S.-J., Ruan J.-S. and Xu J.(2009).** *Streptomyces avicenniae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a rhizosphere of the mangrove plant *Avicennia mariana*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2624–2628.

Xiao K., Kinkel L.L. and Samac D.A. (2002). Biological Control of *Phytophthora* Root Rots on Alfalfa and Soybean with *Streptomyces*. Biol Control. 23: 285–295.

Y

Yan X., Yan H., Liu Z., Liu X., Mo H. and Zhang L.(2011).*Nocardiopsis yanglingensis* sp. nov., a thermophilic strain isolated from a compost of button mushrooms. Antonie Leeuwenhoek. 100:415-419.

Yang R., Zhang L.-P., Guo L.-G., Lu N.S.Z. and Zhang X. (2008).*Nocardiopsis valliformis* sp. nov., an alkaliphilic actinomycete isolated from alkali lake soil in China. Int. J. Syst. Bacteriol. 58: 1542–1546

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. 43:268.

Yassin A.F., Rainey F.A., Burgevlrdt J., Gierth D., Ungerechts J., Lux I., Seifert P., Bal C.and Schaal K.P.(1997). Description of *Nocardiopsis synnematafomans* sp. nov., elevation of *Nocardiopsis alba* subsp. *prasina* to *Nocardiopsis prasina* comb. nov., and designation of *Nocardiopsis antarctica* and *Nocardiopsis alborubida* as later subjective synonyms of *Nocardiopsis dassonvillei*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47(4): 983–988.

Yassin A.F., Spröer C., Hupfer H., Siering C. and Klenk H.-P.(2009). *Nocardiopsis potens* sp. nov., isolated from household waste. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2729–2733.

Yassin A.F., Spröer C., Siering C. and Klenk H.-P.(2010). *Actinomadura sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary infection. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:149–153.

Yekkour A. (2013). Implication de quelques souches de *Streptomyces* antagonistes de *Fusarium culmorum* dans le biocontrôle de la fusariose de l'orge et effets de l'antibiotique sécrété par *Streptomyces* sp. WAB9 sur la survenue d'événements cellulaires liés à cette maladie.

Références bibliographiques

Thèse de doctorat en biotechnologie des microorganismes. Ecole normale supérieure de kouba-alger.85p.

Yekkour A., Meklat A., Bijani C., Toumatia O., Errakhi R., Lebrihi A., Mathieu F., Zitouni A. and Sabaou N.(2015).A novel hydroxamic acid-containing antibiotic produced by a Saharan soil-living *Streptomyces* strain. Lett Appl Microbiol.60:589-596.

Z

Zaitlin B., Watson S.B., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D.(2003). Actinomycetes in lake Ontario: habitats and geosmin and MIB production. Peer Rev J. 95(2):113–118.

Zhang Y.Q., Liu H.Y., Chen J., Yuan L.J., Sun W., Zhang L.X., Zhang Y.Q., Yu L.Y. and Li W.J. (2010). Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai–Tibet plateau, China. Antonie Leeuwenhoek. 98 (2):213-223.

Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F.,Lebrihi A., and Sabaou N.(2005).*Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils of Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Res Microbiol.156: 984–93.

Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004).Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103 I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. J. Antibiot. 57 (6):367–372.

Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. and Labeda D.P.(2004). - *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., a new species isolated from a Saharan soil. Int J Sys and Evol Microbiol. 54: 1377-1381.

Annexes

Annexe

Milieux de culture

I. Milieux d'isolement des actinobactéries

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

Chitine: 2 g; K₂HPO₄: 0,35 g; KH₂PO₄: 0,15 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g; NaCl: 200 g, CaCO₃: 0,02 g; FeSO₄, 7H₂O: 10 mg; ZnSO₄, 7H₂O: 1 mg; MnCl₂, 4H₂O: 1 mg; agar: 18 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL. pH = 7,2.

2. Milieu glycérol-asparagine-agar (Jiang *et al.*, 2012)

Glycérol : 10 g ; asparagine 1 g ; K₂HPO₄, H₂O : 1 g, MgSO₄, 7H₂O : 0.5 g ; CaCO₃ : 0.3 g ; vitamine du milieu CH-V 3.7 mg agar : 15 g ; eau distillée : q.s.p. 1000 mL, pH 7.2.

Pour ces deux milieux, sont ajoutés :

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

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

* Une solution stérile d'un antibactérien l'acide nalidixique (actidione) à 10 mg/L.

II. Milieux d'identification des actinobactéries

1. Etude morphologique

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

1.1.1. Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 mL; pH = 7,2.

1.1.2. Milieu ISP4

Le milieu ISP4 (amidon/sels inorganiques /agar) est prêt à l'emploi (DIFCO). Amidon: 10 g; K₂HPO₄: 1 g; MgSO₄, 7H₂O: 1 g; NaCl: 1 g; (NH₄)₂SO₄: 2 g; CaCO₃: 2 g; solution saline standard*: 1 ml; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml; pH 7,2.

*Solution saline standard : FeSO₄, 7H₂O : 0,1 g ; MnCl₂, 4H₂O : 0,1 g ; ZnSO₄, 7H₂O : 0,1 g ; eau distillée : q.s.p .1000 ml.

III. Milieux de production d'antibiotiques antifongiques

1. Milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966)

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

2. Milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar) (Raper et Fennell, 1965)

Composition : Pomme de terre : 200 g ; agar : 15 g ; glucose : 20 g ; eau distillée : q.s.p .1000 ml pH 5,6 ± 0,2



Caractérisation partielle de deux souches d'*Amycolatopsis* à activité antifongique isolées de deux sols du nord algérien

Laassami Affaf¹, Benmoumou Sarra^{1,2}, Djemouai Nadjette^{1,3}, Berraf-Tebbal Akila^{1,2}, Yekkour Amine^{1,5}, Bouras Noureddine^{1,4}, Sabaou Nasseridine¹ et Meklat Atika^{1,2}

1- Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie.

2- Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb, Blida, Algérie.

3- Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene Bab Ezzouar (USTHB), Algérie.

4- Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algérie.

5- Centre de Recherche Polyvalent, Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie, Alger, Algérie.

E.mail: atika_mek@yahoo.fr

Résumé-

Deux souches d'*Amycolatopsis*, Bm48 et Mg67, ont été isolées à partir du sol de deux régions du nord de l'Algérie: Boumerdès (36°44' Nord, 3°43' Est) et Mostaganem (36°00' Nord, 0°8' Est), respectivement. Ces souches ont été isolées par la méthode des suspensions-dilutions sur le milieu chitine-vitamines agar additionné d'agents sélectifs, puis caractérisées macro- et micro-morphologiquement. Leurs activités antifongiques contre quatre champignons: *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeoconiella chlamydospora* ont été évaluées sur le milieu PDA semi-solide en utilisant la méthode des cylindres d'agar. Les souches Bm48 et Mg67 ont montré une forte activité contre *Phaeoconiella chlamydospora* avec une zone d'inhibition de 40 mm.

Mots clés: *Amycolatopsis*, sol, champignons phytopathogènes, activité antifongique.

Partial characterization of two strains of *Amycolatopsis* with antifungal activity isolated from two soils of the north of Algeria

Abstract-

Two strains of *Amycolatopsis*, Bm48 and Mg67, were isolated from the soil of two regions of the north of Algeria: Boumerdès (36° 44' North, 3° 43' East) and Mostaganem (36 °00' North, 0 ° 8' East), respectively. These strains were isolated by the dilution method on the chitin-vitamin agar medium supplemented with selective agents and then characterized on the basis of the macro- and micro-morphological criteria. Their antifungal activities against four fungi: *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum*, *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* were evaluated on the semi-solid PDA medium using the cylinder agar method. The strains Bm48 and Mg67 showed a strong activity against *Phaeoconiella chlamydospora* with a 40 mm zone of inhibition.

Key words: soil, *Amycolatopsis*, phytopathogen fungi, antifungal activity.

1.- Introduction

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes qui peuvent causer de graves pathologies qui touchent l'homme, les animaux et les végétaux, parmi lesquels on peut citer *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeoconiella chlamydospora* qui provoquent des ravages et des dégâts pour les plantes, les produits agricoles et les denrées alimentaires (Fisher et al., 2012).

Devant le nombre restreint et le manque de molécules bioactives efficaces contre les infections fongiques et étant donné que la source la plus utilisée afin de rechercher de nouvelles molécules efficaces est le milieu naturel particulièrement d'origine microbienne, nous nous sommes intéressés à l'isolement de souches productrices de métabolites secondaires à partir d'écosystèmes peu ou pas exploités afin de mettre en évidence des actinobactéries possédant un potentiel contre les infections d'origine fongiques (Donadio et al., 2002). Les actinobactéries sont un groupe de bactéries à Gram positif possédant un pourcentage de GC supérieur à 55%, abondant et diversifié dans la nature et produisant presque un tiers des antibiotiques naturels (Newman et al., 2002).

Le genre *Amycolatopsis* a été décrit pour la première fois par Lechevalier et al. (1986). Il appartient à la famille des *Pseudonocardiaceae* (Stackebrandt et al., 1997) et représente l'un des genres rares isolés à partir de sol de diverses localités géographiques (Everest et al., 2013), du matériel

clinique (Huang et al., 2004), de végétaux (Duangmal et al., 2011), des grottes et des sédiments marins (Bian et al., 2009). Ce genre contient plusieurs souches productrices d'antibiotiques, particulièrement ceux qui synthétisent l'ansamycine (ex. rifampicine) et les glycopeptides (ex. vancomycine) (Zhao et al., 2010; Everest et Meyers, 2011).

Dans cette optique, l'activité antifongique contre quatre champignons phytopathogènes et/ou mycotoxinogènes de deux souches d'*Amycolatopsis* isolées à partir de sol de deux régions du nord algérien a été étudiée.

2.- Matériel et méthodes

2.1.- Echantillonnage

L'isolement des actinobactéries a été réalisé à partir de deux échantillons de sols durant le mois de Décembre 2016 et provenant de Boumerdès et Mostaganem. Ces échantillons sont prélevés aseptiquement, en surface de la terre (vingt premiers centimètres) et placés dans des sacs stériles scellés puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

2.2.- Isolement des actinobactéries

L'isolement a été réalisé par la méthode de suspension dilution (Rapilly, 1968), après un étalement sur le milieu chitine-vitamines agar (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionné d'un agent antifongique (actidione à raison de 50 mg/l) et deux agents antibactériens (acide nalidixique à raison de 10 mg/l et la polymyxine B à raison de 25 mg/l). Des aliquotes de 0,1 ml des dilutions de 10^{-1} à 10^{-3} ont été étalées sur le milieu utilisé à raison de deux essais par dilution. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30 °C pendant 10 jours.

2.3.- Reconnaissance du genre *Amycolatopsis*

L'observation à l'œil nu et au microscope optique (grossissement $\times 10$ et $\times 40$) des colonies d'actinobactéries a permis la reconnaissance présomptive et la sélection du genre *Amycolatopsis*. La purification des deux souches nommées Bm48 et Mg67 a été réalisée sur le milieu International *Streptomyces* Project n° 2 (ISP2) (Shirling et Gottlieb, 1966).

2.4.- Caractérisation macroscopique et microscopique des deux isolats d'*Amycolatopsis*

L'étude morphologique des deux isolats d'actinobactéries est effectuée sur les milieux ISP2 et ISP4.

L'étude macro-morphologique consiste à déterminer la couleur des mycéliums aériens et du substrat, l'évaluation de la croissance ainsi que la présence des pigments diffusibles.

L'étude micro-morphologique est réalisée par l'observation des deux isolats après 12 jours d'incubation au microscope optique (Optika) à deux grossissements ($\times 10$ et $\times 40$) sur les deux milieux cités précédemment. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycéliums sans altérer les structures en place. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat.

2.5.- Criblage de l'activité antifongique

Les deux souches sélectionnées sont ensemencées en stries serrées à la surface du milieu ISP2. Après 10 jours d'incubation à 30°C, des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre contenant les cultures des actinobactéries sont prélevés et déposés à la surface du milieu Potato Dextrose Agar (PDA) semi-solide ensemencé préalablement avec le champignon-cible. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à 4°C pendant deux heures pour permettre la diffusion des substances sécrétées par les actinobactéries tout en inhibant momentanément les champignons, puis sont incubées à 30 °C pendant 48 h. L'activité antifongique est évaluée par la mesure du diamètre d'inhibition des champignons autour des disques des actinobactéries. Les champignons proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. *Aspergillus carbonarius* est un champignon toxigène (producteur d'ochratoxine A). *Fusarium culmorum* est phytopathogène (céréales, dont le blé) et toxigène. *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeoconiella chlamydospora* sont phytopathogènes (maladie de la vigne).

3.- Résultats et discussion

3.1- Étude morphologique des deux isolats d'*Amycolatopsis*

Les deux isolats d'*Amycolatopsis* ont été reconnus tout d'abord à travers des observations à l'œil nu et au microscope photonique. Par la suite, ces isolats ont été étudiés de manière plus détaillée.

L'étude macro- et micro-morphologique effectuée sur les milieux ISP2 et ISP4 a montré que:

Ces deux souches sont caractérisées par une bonne croissance sur le milieu ISP2 et une croissance moyenne sur le milieu ISP4. La couleur du mycélium aérien varie entre le jaune grisâtre, le blanc et le beige blanchâtre. En revanche, le mycélium du substrat montre des couleurs différentes. Ces

souches ne produisent pas de pigments diffusibles (Tableau 1). Le mycélium du substrat est plus ou moins fragmenté et le mycélium aérien porte des filaments très longs, plus ou moins irréguliers et très fins. Le mycélium aérien se fragmente en zig-zag pour donner de longues chaînes de structures ayant la forme de bâtonnets (Figure 1).

Tableau 1- Caractéristiques culturales des deux souches d'*Amycolatopsis*.

Isolats d'actinobactéries	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
Bm48	ISP2	++++	Jaune grisâtre	Brun moyen (+/-foncé)	–
	ISP4	++ à +++	Blanc	Jaune pâle à clair	–
Mg67	ISP2	+++ à ++++	Beige blanchâtre	Jaune	–
	ISP4	++ à +++	Beige blanchâtre	Beige	–

MA = mycélium aérien, **MS** = Mycélium du substrat, **PS** = Pigments solubles dans le milieu de culture, – : absence du PS, ++: croissance moyenne, +++: bonne croissance, ++++: très bonne croissance.



Figure 1- Micromorphologie du mycélium aérien de l'isolat Bm48 après 12 jours d'incubation sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique (G ×40 avec effet de zoom).

3.2-Activité antifongique

Le résultat du screening de l'activité antifongique des deux isolats d'*Amycolatopsis* contre les champignons *Aspergillus carbonarius*, *Fusarium culmorum*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomonium chlamydospora* est donné dans le tableau 2.

L'activité antifongique des deux souches isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar, une méthode de diffusion en milieu gélosé qui se prête mieux à la détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux molécules antifongiques produites par les souches d'*Amycolatopsis* testées.

Tableau 2- Activité antifongique des deux souches d'*Amycolatopsis*.

Isolat d'actinobactéries	Diamètre d'inhibition (mm)			
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Phaeoemoniella aleophilum</i>	<i>Phaeoemoniella chlamydospora</i>
Bm48	25	14	17	40
Mg67	16	-	20	40

Le diamètre d'inhibition comprend celui du disque qui est de 10 mm. - = pas d'activité.

Les deux isolats d'*Amycolatopsis* possèdent une activité antifongique intéressante contre *P. chlamydospora* avec un diamètre d'inhibition de 40 mm. La souche Bm48 a présenté une faible activité antifongique contre *F. culmorum* et *P. aleophilum* et une activité moyenne contre *A. carbonarius*. La souche Mg67 n'a montré aucune activité contre *F. culmorum* et une activité faible contre *A. carbonarius* et *P. aleophilum*.

Le genre *Amycolatopsis* comporte à l'heure actuelle 70 espèces (Euzéby, 2017) dont certaines sont une source riche de métabolites secondaires y compris quelques antifongiques cliniquement importants tels que l'octacosamicine produite par *A. azurea* (Dobashi et al., 1988), la rifamycine produite par *A. mediterranei* (Meja et al., 1997) et la vancomycine d'*Amycolatopsis* sp. ST 101170 (Hopmann, 2002).

4. Conclusion

Récemment, un intérêt grandissant a été dirigé vers les genres rares d'actinobactéries, notamment le genre *Amycolatopsis*, car il fait partie des genres producteurs d'antibiotiques. Nos résultats indiquent que les isolats d'origine terrestre sont une source potentielle intéressante de substances antifongiques et que nos deux souches Bm48 et Mg67 possèdent une forte activité contre *P. chlamydospora* qui mérite une étude approfondie.

5. Références bibliographiques

BIAN J., LI Y., WANG J., SONG F.-H., LIU M., DAI H.-Q., REN B., GAO H., HU X., LIU Z.-H., LI W.-J. et Zhang L.-X., 2009.- *Amycolatopsis marina* sp. nov., an actinomycete isolated from an ocean sediment.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 59: 477-481.

DOBASHI K., NAGANAWA H., TAKAHASHI Y., TAKITA T. et TAKEUCHI T., 1988.- Novel antifungal antibiotics octacosamicins A and B, II : the structure elucidation using various NMR spectroscopic methods. The journal of antibiotics, vol. XLI (11): 1533-1541.

DONADIO S., MONCIARDINI P., ALDUINA R., MAZA P., CHIOCHINI C., CAVALETI L., SOSIO M. et PUGLIA A.M., 2002.- Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. Journal of Biotechnology, vol. 9: 187-198.

DUANGMAL K., MINGMA R., PATHOM-AREE W., THAMCHAIPENET A., INAHASHI Y., MATSUMOTO A. et TAKAHASHI Y., 2011.- *Amycolatopsis samanae* sp. nov., isolated from roots of *Samanea saman* (Jacq) (Merr.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 61: 951-955.

EUZÉBY J. P., 2017.- List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. <http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>

EVEREST G. J. et MEYERS P. R., 2011.- Evaluation of the antibiotic biosynthetic potential of the genus *Amycolatopsis* and description of *Amycolatopsis circi* sp. nov., *Amycolatopsis equina* sp. nov. and *Amycolatopsis hippodromi* sp. nov. Journal of Applied Microbiology, vol. 111: 300-311.

EVEREST G. J., LE ROES-HILL M., OMOROGIE C., CHEUNG S.-K., COOK A. E., Goodwin C. M. et MEYERS P. R., 2013.- *Amycolatopsis umgeniensis* sp. nov., isolated from soil from the banks of the Umgeni River in South Africa. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 103: 673-681.

FISHER M. C., HENK D. A., BRIGGS C. J., BROWNSTEIN J. S., MADOFF L. C., MCCRAW S. L. et GURR S. J., 2012.- Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature, vol. 484: 186-194.

HAYAKAWA M. et NONOMURA H., 1987.- Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. Journal of Fermentation Technology, vol. 65: 501-509.

HOPMANN C., KURZ M., BRONSTRUP M., WINK J. ET LEBELLER D., 2002.- Isolation and structure elucidation of vancoresmycin a new antibiotic from *Amycolatopsis* sp. ST 101170. Tetrahedron Letters, vol. 43(3):435-438.

HUANG Y., PAŚCIAK M., LIU Z., XIE Q. et GAMIAN A., 2004.- *Amycolatopsis palatopharyngis* sp. nov., a potentially pathogenic actinomycete isolated from a human clinical source. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 54: 359-363.

LECHEVALIER M. P., PRAUSER H., LABEDA D. P. et RUAN J.-S., 1986.- Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 36: 29-37.

- MEJÍA A., BARRIOS-GONZÁLEZ J. et VINIEGRA-GONZÁLEZ G., 1998.- Overproduction of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* and its relationship with the toxic effect of barbital on growth. *Journal of Antibiotics*, vol. 51(1): 58-63.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. ET SNADER, K.M., 2003.- Natural Products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, vol. 66: 1022–1037.
- RAPILY F. 1968.- Techniques de mycologie en pathologie végétale. An. Epiphyties, vol. 19, numéro hors série.
- SHIRLING E. B. et GOTLIEB D., 1966.- Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 16: 313-340.
- STACKEBRANDT E., RAINEY F. A. et WARD-RAINEY N. L., 1997.- Proposal for a 326 hierarchic system, *Actinobacteria* classis nov. *International journal of systematic bacteriology*, vol. 47: 479-491.
- ZHAO W., ZHONG Y., YUAN H., WANG J., ZHENG H., WANG Y., CEN X., XU F., BAI J. HAN X., Lu G., ZHU Y., SHAO Z., YAN H., Li C., PENG N., ZHAN Z., ZHANG Y., LIN W., FANY., QIN Z., HU Y., ZHU B., WANG S., DING X. et ZHAO G.-P., 2010.- Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell Research*, vol. 20: 1096-1108.