

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

Université Mentouri-Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N°ordre : 84 IT.E / 2007
SERIE : 05 ISN / 2007

Thèse présentée par : **KITOUNI Mahmoud**
En vue de l'obtention du Diplôme de : **DOCTORAT D'ETAT** en :
MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Intitulée :

**ISOLEMENT DE BACTÉRIES ACTINOMYCÉTALES
PRODUCTRICES D'ANTIBIOTIQUES À PARTIR
D'ÉCOSYSTÈMES EXTRÊMES.
IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES SOUCHES ACTIVES ET
CARACTÉRISATION PRÉLIMINAIRE DES SUBSTANCES
ÉLABORÉES**

Membres du jury :

Mr BENGUEDOUAR A.	Professeur	Président	Univ. Mentouri-Constantine
Mr BOULAHROUF A.	Professeur	Directeur de thèse	Univ. Mentouri-Constantine
Mr BOIRON P.	Professeur	Examineur	Univ. Lyon 1
Mr KARAM N.	Professeur	Examineur	Univ. Essania-Oran
Mr BELLAHCENE M.	Maître de Conférences	Examineur	Univ. Mostaganem
Mr HADDI M.L.	Maître de Conférences	Examineur	Univ. Mentouri-Constantine

Session 2007

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de génie microbiologique et applications de l'Université Mentouri de Constantine.

Que Monsieur Abderrahmane Boulahrouf (Professeur à l'Université Mentouri de Constantine) trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance pour avoir accepté la responsabilité de ce travail.

Je remercie Monsieur Amar Benguedouar (Professeur à l'Université Mentouri de Constantine) de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements vont également à Monsieur Patrick Boiron (Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1) pour la confiance et l'accueil chaleureux qui ma réservé à Lyon, ses précieux conseils et d'avoir accepté de se déplacer à Constantine pour participer à ce jury.

Je ne saurais oublié Messieurs Noureddine Karam (Professeur à l'Université Essania Oran) et Miloud Bellahcene (Maître de Conférences à l'Université de Mostaganem) qui sans hésitation ont accepté de se déplacer pour siéger dans ce jury.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Mohamed Laid Haddi (Maître de Conférences à l'Université Mentouri de Constantine) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

La partie identification moléculaire a été réalisée au laboratoire de Mycologie de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Je suis très reconnaissant à Madame André Couble et Delphine Mouniee de m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire et qui ont veillé sur la réalisation de ces travaux et avec qui les discussions ont été toujours fructueuses.

Je dois une profonde reconnaissance à ma chère épouse Lamia qui a suivi de très près ce travail avec une grande attention et une disponibilité remarquable. C'est avec gentillesse et patience qu'elle m'a fait toujours bénéficier de ses conseils.

Mes remerciements vont également à Madame Hayet Goudjil ep. Benhizia qui a réalisé la prise des photos au microscope optique, ainsi que Monsieur Abdennour Zertal et Mademoiselle Hajira qui ont réalisé les spectres UV-Visibles et L'analyse des échantillons par HPLC.

Que mes remerciements aillent aussi a mes amis pour l'amitié et la sympathie qu'ils m'ont témoigné durant ces années.

DEDICACES

A mon défunt papa, qui ma toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite.

A ma très chère maman, pour m'avoir toujours écoutée, pour son soutien moral et ces précieux conseils.

A ma tendre épouse Lamia qui ma encouragé, qui ma donné la force et la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés.

A mon poussin Moncef, ma joie, mon bonheur et ma raison de vivre

Quoique que je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi. Si je suis arrivé là, c'est bien grâce à vous. Que dieu vous bénisses, vous donne longue vie et vous protège pour moi.

A ma famille, à mes amis, je dédie ce mémoire Said.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

DEDICACES

Introduction générale 1

Revue bibliographique

1- Résistance aux antibactériens	4
1-1 L'adaptation des bactéries à l'agression des antibactériens	4
1-1-1 Stratégie quantitative.....	4
1-1-2 Stratégie qualitative.....	4
1-2 Epidémiologie de la résistance aux antibactériens	5
2- Actinomycètes	7
2-1 Définition et caractéristiques principales	7
2-2 Ecologie.....	10
2-3 Biologie du développement.....	14
2-3-1 Mycélium de substrat et mycélium aérien	14
2-3-2 Structures particulières	15
2-3-3 Formation des spores.....	16
- Les endospores	16
- Les exospores	16
2-4 Taxonomie.....	17
2-4-1 Taxonomie phénétique	18
2-4-2 Taxonomie numérique	19
2-4-3 Chimiotaxonomie.....	19
- Composition en aminoacides.....	21
- Composition en sucres.....	21
- Composition en lipides.....	23
2-4-4 Taxonomie moléculaire.....	23
- Détermination du G + C %.....	23
- Les hybridations d'acides nucléiques	25
- Etude de l'ARN 16S.....	26
- Phylogénie des actinomycètes.....	28
2-4-5 Taxonomie mixte et consensuelle (polyphasic taxonomy)	28
2-5 Classification	29
3- Les antibiotiques produits par les actinomycètes	34
3-1 Généralités	34
3-2 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne	39
3-2-1 Paroi bactérienne et synthèse du peptidoglycane.....	39
3-2-2 Structure et mode d'action des antibiotiques de type β -lactame.....	41
3-2-3 Structure et mode d'action des glycopeptides.....	43
3-2-4 Structure et mode d'action de la fosfomycine.....	45
3-3 Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.....	47
3-3-1 Structure des Macrolides et apparentés (MLS).....	47
3-3-2 Structure et mode d'action des phénicolés.....	49
3-3-3 Structure et mode d'action des aminoglycosides.....	52
3-3-4 Structure et mode d'action des Tétracyclines	54
3-4 Antibiotiques agissant au niveau de l'ARN polymérase (les Rifamycines).....	56

Partie expérimentale

Optimisation d'un protocole d'isolement, étude de la diversité des actinomycètes dans les écosystèmes explorés et mise en évidence de l'activité antibiotique

1- Prélèvement des échantillons	57
1-1 Sol.....	57
1-2 Eau.....	57
1-3 Ecorces d'arbres	57
2- Traitement des échantillons.....	57
3- Isolement, purification et conservation des actinomycètes	58
4- Identification moléculaire des souches d'actinomycètes isolées.....	58
4-1 Extraction de l'ADN.....	58
4-2 PCR universelle.....	58
4-3 Electrophorèse	59
4-3 Purification des bandes d'ADN à partir de gel d'agarose	59
4-5 Séquençage.....	60
4-6 Analyse des séquences	60
5- Recherche de l'activité antimicrobienne	60
5-1 Recherche de l'activité antibactérienne.....	60
5-1-1 Inocula des bactéries-tests.....	60
5-1-2 Technique des cylindres d'agar.....	61
5-1-3 Technique des puits.....	61
5-2 Recherche de l'activité antifongique	61

Identification morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire des souches représentatives

1- Etude phénotypique	63
1-1- Préparation des inocula des souches représentatives	63
1-1-1 Inoculum général.....	63
1-1-2 Inoculum lavé.....	63
1-2- Etude morphologique	63
1-2-1 Caractères culturels.....	63
1-2-2 Aspect en microscopie optique	64
1-3- Etude chimiotaxonomique	64
1-3-1 Préparation des cellules.....	64
1-3-2 Détermination des acides aminés des cellules entières	64
1-3-3 Détermination des sucres	65
1-4- Etude physiologique.....	65
1-4-1 Production de pigments mélanoides.....	65
1-4-2 Hydrolyse de l'amidon	65
1-4-3 Hydrolyse de la gélatine.....	66
1-4-4 Hydrolyse de la caséine.....	66
1-4-5 Action sur le lait écrémé	66
1-4-6 Tolérance au chlorure de sodium	66
1-4-7- Croissance à différentes températures des souches représentatives	66
1-5- Etude biochimique	67
1-5-1 Utilisation de différents substrat carbonés	67
1-5-2 Utilisation du citrate comme seule source de carbone	67

1-5-3 Réduction des nitrates	67
1-5-4 Recherche de l'Uréase.....	68
1-5-5 Recherche de la production d'indole.....	68
2- Identification moléculaire des souches représentatives.....	68
2-1 Séquençage	69
2-2 Analyse des séquences	69
2-3 Analyse phylogénétique	69
2-4 Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques	69

Etude préliminaire des antibactériens produits par les souches représentatives

1- Choix du milieu optimal de production des antibactériens	72
2- Etude de l'activité antibactérienne	72
2-1 Culture des actinomycétales à activité antibactérienne en milieu liquide.....	72
2-2 Préparation des surnageants et des extraits	72
2-3 Culture des actinomycétales à activité antibactérienne en milieu solide	73
2-4 Technique des disques.....	73
2-5 Technique des puits	73
3- Séparation des molécules bioactives	75
3-1 Chromatographie ascendante sur papier (Bétina, 1965).....	75
3-2 Système éluant.....	75
3-3 Bioautographie des molécules bioactives.....	75
4- Etude spectrale des molécules bioactives.....	76
4-1- Spèctre UV-Visible des molécules bioactives	76
4-2- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	76

Résultats et discussion

Optimisation d'un protocole d'isolement, étude de la diversité des actinomycètes dans les écosystèmes explorés et mise en évidence de l'activité antibiotique

1- Résultats	78
1-1- Isolement des souches actinomycétales	78
1-2- Diversité des actinomycètes isolés.....	80
1-3- Tests d'activité	84
2- Discussion.....	87

Identification morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire des souches représentatives

1- Résultats	95
1-1 Etude morphologique	95
1-1-1 Caractères cultureux	95
1-1-2 Observation au microscope optique	97
1-2 Etude chimiotaxonomique.....	100
1-3 Etude physiologique et biochimique	100
1-4 Analyse phylogénétique	104
2- Discussion.....	109

Etude préliminaire des antibactériens produits par les souches représentatives

Résultats et Discussion	126
1- Choix du milieu de production d'antibactériens	126
1-1 Activité antibactérienne des trois isolats	126
1-2 l'isolat ES4	128
1-3 l'isolat SS4.....	128
1-4 l'isolat SS5.....	131
1-5 Conclusion.....	131
2- Extraction des biomolécules actives.....	133
2-1 Culture en milieu liquide.....	133
2-2 Extraction à partir des milieux gélosés.....	133
2-3 Séparation des molécules bioactives par chromatographie sur papier	135
2-4 Spectre UV-Visible des extraits actifs.....	140
2-5 Séparation des substances bioactives par HPLC	140
2-6 Stabilité de l'activité antibactérienne	142
Conclusion générale et Perspectives.....	144
Références bibliographiques.....	150
Annexe	171

Liste des tableaux

TABLEAU N° 1 : Répartition des actinomycètes dans la nature (Goodfellow ; 1983).....	9
TABLEAU N°2 : Distribution du type du radical acétyle de l'acide muramique au sein des actinomycètes	20
Tableau N°3 : Classification des peptidoglycanes des actinomycètes d'après Rogers et Becker (1980).	20
Tableau N°4 : Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires des actinomycètes (Lechavalier et Lechevalier, 1970)	22
TABLEAU N°5 : Valeur du coefficient de Chargaff pour les différents genres d'actinomycétales	24
TABLEAU N°6 : Principaux groupes et genres actinomycètes (Actinobactéries non incluses).....	31
TABLEAU N°7 : Métabolites secondaires produit par les actinomycètes selon les groupes chimiques 1990.....	35
TABLEAU N°8 : Nombre de classes chimiques produites par les différents genres d'actinomycètes (1990-1994)	35
TABLEAU N°9 : Bioactivité des métabolites isolés à partir d'actinomycetes (1990-1994)	37
TABLEAU N°10 : Aminoglycosides contenant le cycle 2-DOS.....	51
TABLEAU N°11 : Aminoglycosides ne contenant pas le cycle 2-DOS.	53
TABLEAU N°12a : Classification des antibiotiques en classes selon Betina, 1965.	74
TABLEAU N°13a : Nombre d'actinomycètes isolés d'échantillon de sol de sebkha ...	77
TABLEAU N°13b : Nombre d'actinomycètes isolés d'échantillon d'eau de sebkha. ...	77
TABLEAU N°14 : Criblage initial des souches d'actinomycètes (culture en milieu gélosé)	79
TABLEAU N°15 : Activité antibactérienne des actinomycètes isolés	85
TABLEAU N°16 : Activité antifongique des actinomycètes isolés	85
TABLEAU N°17 : Pourcentage des souches d'actinomycètes à activité antibactérienne cultivées sur les milieux GLM et Bennett.	86
TABLEAU N°18 : Pourcentage des souches d'actinomycètes à activité antifongique cultivées sur les milieux GLM et Bennett	86
TABLEAU N°19 : Caractères cultureux de la souche ES4	94
TABLEAU N°20 : Caractères cultureux de la souche SS4	94
TABLEAU N°21 : Caractères cultureux de la souche SS5	94
TABLEAU N°22 : Etude Chimiotaxonomique des souches ES4, SS4 et SS5	99
TABLEAU N°23 : Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches (ES4, SS4 et SS5)	101
TABLEAU N°24 : Croissance des souches actinomycetales à différentes températures.....	102
TABLEAU N°25 : Les degrés de similarité entre les séquences de l'ARNr 16S des souches ES4, SS4, SS5 et des espèces représentatives des genres <i>Streptomyces</i> et <i>Actinomadura</i>	103
TABLEAU N°26 : Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S des bactéries du genre <i>Streptomyces</i>	106
TABLEAU N°27 : Matrice des distances calculées à partir des séquences de 120 pb (région hypervariable) des bactéries du genre <i>Streptomyces</i>	110
TABLEAU N°28 : Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S des bactéries du genre <i>Actinomadura</i>	113
TABLEAU N°29 : Propriétés phénotypiques de la souche SS4, <i>S. caviscabies</i> et <i>S. setonii</i>	118

TABLEAU N°30 : Caractères distinctifs entre le genre <i>Actinomadura</i> et les genres morphologiquement et biochimiquement similaires.	121
TABLEAU N°31 : Propriétés phénotypiques de la souche SS5 et <i>A. myerii</i>	123
TABLEAU N°32 : Activité antibactérienne des isolats ES4, SS4 et SS5, en fonction des milieux de production, vis-à-vis des bactéries-tests.	125
TABLEAU N°33 : Activité antibactérienne, vis-à-vis des bactéries-tests, des différents extraits organiques des cultures des isolats ES4, SS4 et SS5 sur le milieu de Bennett gélosé	134
TABLEAU N°34 : Rapport frontaux calculés	138
TABLEAU N°35 : Activité des extraits des isolats ES4, SS4 et SS5 après différents traitements contre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	144

Liste des figures

FIGURE N°1 : Distribution verticale des actinomycètes dans le sol	11
FIGURE N°2 : Arbre phylogénétique du domaine des bactéries	27
FIGURE N°3 : Système de classification hiérarchique proposé par Stackebrandt de la classe des <i>Actinobacteria</i>	33
FIGURE N°4 : Schéma en coupe de la paroi des eubactéries	38
FIGURE N°5 : (a) Composition de la sous-unité de base et (b) structure générale du peptidoglycane	38
FIGURE N°6 : Similarité de structure entre les antibiotiques à noyau β -lactames et le substrat naturel des DD-peptidases (D-alanyl-D-alanine)	40
FIGURE N°7 : Les différentes classes d'antibiotiques à noyau β -lactame	40
FIGURE N°8 : Structure de la vancomycine	42
FIGURE N°9 : Mode d'action de la vancomycine.....	42
FIGURE N°10 : Structure de la fosfomycine.....	44
FIGURE N°11 . Structure chimique de l'érythromycine A	46
FIGURE N°12 . Classification des macrolides	46
FIGURE N°13 : Structure chimique de la lincomycine et de la clindamycine	48
FIGURE N°14 : Structure chimique des streptogramines B	48
FIGURE N°15 : Structure du Chloramphénicol.....	50
FIGURE N°16 : Structure du Thiamphénicol	50
FIGURE N°17 : Squelette des tetracyclines.....	55
FIGURE N° 18 : Structure de la rifampicine	55
FIGURE N°19 : Chromatogramme sous format chromas (souche SS4)	81
FIGURE N°20 : Séquence de la souche SS4.....	81
FIGURE N°21 : Arbre montrant la position phylogénétique des 22 isolats parmi les espèces représentatives des genres <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> et <i>Actinomadura</i>	82
FIGURE N°22a : Test d'activité contre <i>Staphylococcus aureus</i> Mu 50 par la technique des cylindres d'agar.....	83
FIGURE N°22b : Test d'activité contre <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 par la technique des cylindres d'agar.....	83
Figure 23a : Photos des isolats ES4 et SS4 sur différents milieux de culture	96
Figure 23b : Photos des isolats ES4 et SS4 sur différents milieux de culture	96
FIGURE N°24a : Photos de l'isolat SS5 sur le milieu sporulation agar	96
FIGURE N°24b : Photos de l'isolat SS5 sur différents milieux de culture	98
FIGURE N°25 : Les souches ES4, SS4 et SS5 en microscope optique.....	98
FIGURE N°26 : Arbre montrant la position phylogénétique des isolats ES4 et SS4 parmi les espèces représentatives du genre <i>Streptomyces</i>	105
FIGURE N°27 : Arbre montrant la position phylogénétique de isolat ES4 parmi les espèces représentatives du genre <i>Streptomyces</i>	108
FIGURE N°28 : Arbre montrant la position phylogénétique de l'isolat SS5 parmi les espèces représentatives du genre <i>Actinomadura</i>	112
Figure N° 29a : Activité antibactérienne de l'isolat ES4 en fonction des bactéries-tests	127
Figure N° 29b : Activité antibactérienne de l'isolat ES4 en fonction des milieux de production vis-à-vis de chaque bactérie-test.....	127
Figure N° 29c : Activité antibactérienne de l'isolat ES4 en fonction des milieux de production	127
Figure N° 30a : Activité antibactérienne de l'isolat SS4 en fonction des bactéries-tests	129
Figure N° 30b : Activité antibactérienne de l'isolat SS4 en fonction des milieux de production vis-à-vis de chaque bactérie-test.....	129

Figure N° 30c : Activité antibactérienne de l'isolat SS4 en fonction des milieux de production	129
Figure N° 31a : Activité antibactérienne de l'isolat SS5 en fonction des bactéries-tests	130
Figure N° 31b : Activité antibactérienne de l'isolat SS5 en fonction des milieux de production vis-à-vis de chaque bactérie-test.....	130
Figure N° 31c : Activité antibactérienne de l'isolat SS5 en fonction des milieux de production	130
Figure N° 32 : Moyenne des zone d'inhibition pour les isolats ES4, SS4 et SS5 en fonction des milieux de production d'antibactériens.....	132
Figure N° 33 : Cinétique de croissance et de production de substances à activité antibactérienne de la souche ES4 en fermenteur de 2 litres	132
Figure N° 34a : Activité des extraits de l'isolat ES4 en fonction des solvants et des bactéries-tests.....	136
Figure N° 34b : Activité des extraits de l'isolat ES4 en fonction des solvants.....	136
Figure 34c : Activité des extraits de l'isolat SS4 en fonction des solvants et des bactéries-tests.....	136
Figure 34d : Activité des extraits de l'isolat SS4 en fonction des solvants.....	137
Figure N° 35a : Activité des extraits de l'isolat SS5 en fonction des solvants et des bactéries-tests.....	137
Figure N° 35b : Activité des extraits de l'isolat SS5 en fonction des solvants	137
Figure N° 36 : Spectres UV-Visible des extraits actifs des isolats ES4, SS4 et SS5	140
Figure N° 37 : Profils chromatographiques des extraits actifs des isolats ES4, SS4 et SS5	142
Figure N° 38 : Activité des extraits organiques des isolats ES4, SS4 et SS5 contre <i>St. aureus</i> ATCC 29213 après différents traitements	144
Photographie a : Activité des extraits chloroformiques des souches ES4, SS4 et SS5 sur <i>S. aureus</i> Mu 50. Photographie b : Activités des extraits hexanoïques des souches ES4, SS4 et SS5 sur <i>S. aureus</i> Mu 50 :	134

ملخص

لقد تم عزل 45 سلالة بكتيرية من نوع الأكتينومييسات انطلاقا من عينات تربة، ماء و جذوع الأشجار. تم البحث على قدرة إنتاج المضادات الحيوية بطرق الانتشار للمضادات الحيوية في البيئة المغذية و ضد ثلاثة سلالات بكتيرية ممرضة موجبة الغرام و ثلاثة سلالات بكتيرية ممرضة سالبة الغرام و ثلاثة خمائر و ثلاثة فطريات مختلفة.

كل سلالات الأكتينومييسات المدروسة أظهرت قدرتها على تثبيط نمو سلالة بكتيرية ممرضة واحدة على الأقل. ثلاثة و تسعون بالمئة من عزلات الأكتينومييسات تم التعرف عليها عن طريق ال-PCR و هي من نوع *Streptomyces* في حين 4 % تنتمي إلى جنس *Nocardia* و 2 % لجنس *Actinomadura*. تقنيات البيولوجية الجزيئية المجرات على السلالات ES4 و SS4 و SS5 مكنتنا من التعرف على السلالة SS4 وتصنيفها *S. setonii* في حين السلالتين ES4 و SS5 تبدوان سلالتين جديدتين. بالنسبة للجزيئات الفعالة، فقد تم انسابها إلى قسم ال-*Streptomycine* و ال-*Illudine*. وذلك باستخلاص المواد الفعالة بواسطة عدة مذيبات عضوية و فصلها بتقنية الكروماتوغرافيا على الورق. الخواص الفيزيائية و الكيميائية للمواد الفعالة تمت دراستها بالتقنيات الطيفية *spectres UV-visibles* و HPLC هذا من جهة و دراسة المحافظة على قدرة تثبيط البكتريا الممرضة بعد تعريض المستخلصات لمختلف العوامل.

الكلمات المفتاحية

Actinomycètes, écosystèmes extrêmes, antibiotiques, phylogénie

Résumé

45 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons d'eau, de sol et d'écorces d'arbres prélevés d'écosystèmes où les conditions physicochimiques (aridité, salinité, forte pollution...) sont extrêmes. L'activité antimicrobienne a été effectuée contre trois bactéries Gram positives, trois bactéries Gram négatives, trois levures et trois champignons filamenteux. Elle a été réalisée par la technique des cylindres d'agar. Parmi les 45 isolats 17 souches (**37,78 %**) ont montré une activité contre au moins une bactérie-tests étudiées. **Quatre vingt treize pour cent** des souches actives ont été identifiées par la PCR universelle comme étant appartenir au **genre *Streptomyces***, **4 %** au **genre *Nocardia*** et **2 %** au **genre *Actinomadura***. L'identification moléculaire des souches **ES4**, **SS4** et **SS5** nous a permis d'assigner la souche **SS4** à *S. setonii*, tandis que les isolat **ES4** et **SS4** représentent probablement de nouvelles espèces. L'extraction par différents solvants organiques, la séparation des molécules bioactives par chromatographie sur papier nous a permis de les classer dans la classe de la streptomycine et la classe de l'illudine. Les propriétés physicochimiques des antibactériens extraits ont été déterminées par l'étude spectrale par spectrophotométrie UV-Visible et HPLC. Ainsi que l'étude de la stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de plusieurs paramètres.

Mots clés : Actinomycètes, écosystèmes extrêmes, antibiotiques, phylogénie

Abstract

45 strains of actinomycètes were isolated from samples of water, soil and tree barks collected from ecosystems where physico-chemical conditions (aridity, salinity, pollution...) are extreme. Antimicrobial activity was tested using the agar cylinder method against three Gram-positive bacteria, Gram-negative three bacteria, three yeast and filamentous three fungi. Among 45 isolated 17 (37,78 %) strains showed an activity against at least one of the test-bacteria studied and 2 (4,44 %) showed antifungal activity. Ninety-three percent of actinomycetes identified by the universal PCR as belonging to the *Streptomyces* genus, 4 % to the *Nocardia* genus and 2 % to the *Actinomadura* genus. The molecular identification of ES4, SS4 and SS5 strains enabled us to assign SS4 with *S. setonii*, while ES4 and SS4 they represent probably new species. The extraction by various organic solvents, the separation of the bioactives molecules by paper chromatography enabled us to classify them in the streptomycine class and illudine class. The physico-chemical properties of the extracted antibacterials were determined by the spectral study by UV-Visible spectrophotometry and HPLC. As well as the study of the stability of the antibactériel activity according to several parameters.

Keywords: Actinomycetes, extremes ecosystems, antibiotics, phylogeny

Introduction

Introduction générale

Les voies de recherche du futur en matière de chimiothérapie anti-infectieuse sont difficiles à définir. En effet, les problèmes actuels seront-ils ceux de demain ?

Il y a quelques décennies, le monde croyait que la science avait triomphé des maladies infectieuses et que tout était sous contrôle. Les vaccins et les antibiotiques ont effectivement permis de vaincre ou contrôler certains fléaux comme la variole ou la tuberculose. On a même cru, un bref instant, que les menaces bactériennes et virales appartenaient au passé. Mais certains événements nous rappellent que nous devrions toujours faire face à de nouveaux défis infectieux : 8400 patients dans plus de 30 pays ont été atteints du syndrome respiratoire aigu (SRAS) en 2003, la grippe aviaire s'est transmise aux humains, le SIDA (grand fléau du siècle passé) continue de faire des victimes, les épidémies de fièvres hémorragiques font des ravages en Afrique et de nombreuses questions restent ouvertes sur la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

L'émergence de nouveaux microbes et la transmission de ceux-ci ont été favorisées, entre autres, par la mobilité croissante des gens, l'exportation d'animaux et de nourriture, une population plus âgée avec des co-morbidités plus importantes (HIV, patients transplantés, patients immunodéprimés) ainsi que par des attitudes thérapeutiques parfois plus agressives, en particulier dans le contexte des soins intensifs. L'apparition de nouvelles maladies et la réémergence d'anciennes ne sont finalement que des signes d'une impressionnante adaptabilité des microorganismes à notre environnement changeant et à nos moyens de défense.

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développé des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens. Ces résistances aux antibiotiques aux doses thérapeutiques apparaissent plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leur sont résistantes. Il existe pour l'instant quelques exceptions comme l'absence de souches de *Streptococcus pyogenes* résistante à la pénicilline G. (Genné et Siegrist, 2003) Le mécanisme de résistance peut avoir comme support génétique un gène d'origine plasmidique ou chromosomique. La réponse de la bactérie est souvent complexe, il peut s'agir d'empêcher l'antibiotique de pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne, d'inactiver le xénobiotique par des enzymes ou modifier le site d'action de l'antibiotique, voir de synthétiser des systèmes additionnels qui permettent de contourner l'action de l'antibiotique, voir de le refouler activement à l'extérieur (efflux).

Toutes les espèces ou genres bactériens sont concernés par le phénomène de la résistance aux antibactériens posant parfois de véritables problèmes thérapeutiques.

La résistance aux antibactériens est un phénomène universel, qui semble plus aigu dans certains pays en voie de développement du fait de la monotonie des antibiotiques utilisables. Dans les pays industrialisés, le même phénomène peut être décrit du fait de pression sélective dans un hôpital donné, ceci a été bien démontré avec l'usage intensif en monothérapie de la ceftazidime ou l'usage excessif de l'imipénème dans les unités de soins intensifs qui a permis l'émergence de *Stenotrophomonas maltophilia* (**Bryskier, 1999**).

Devant cette émergence de l'antibiorésistance, la découverte de nouvelles molécules représente donc un besoin qui ne peut être comblé que soit par :

- l'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriés,
- la réalisation de nouvelles molécules semisynthétiques à partir de structures connues ou la synthèse de nouveaux dérivés,
- l'analyse des produits de fermentation de nouvelles espèces bactérienne ou fongiques isolées d'écosystèmes peu ou pas explorés.

C'est cette dernière voie que nous avons adoptée lors de notre étude. De nombreux organismes capables d'élaborer des molécules à activité antimicrobienne peuvent être exploités parmi lesquels nous citerons : les microorganismes, les plantes, les lichens, les insectes et les mollusques (**Berdy, 1974**).

La principale source d'antibiotiques est représentée par les microorganismes qui, depuis longtemps font l'objet de nombreuses recherches et ont permis et permettent toujours la découverte de métabolites secondaires intéressants et exploitables par l'homme. Les antibiotiques décrits se répartissent en fonction du type d'organisme producteur de la façon suivante (**Breton et al., 1989**) :

- Bactéries autres que les actinomycètes	: 09 %
- Champignons	: 15 %
- Actinomycètes	: 43 %
- Lichens	: 01 %
- Algues	: 02 %
- Plantes supérieures	: 23 %
- Animaux	: 07 %

Les actinomycètes représentent donc la principale source de métabolites à activité anticellulaire.

Le terme d'actinomycète a été utilisé pour la première fois par **Bollinger**, en **1877**, pour désigner l'agent responsable d'une maladie du bétail. L'agent étiologique des actinomycoses, précédemment décrit par **Harz** sous forme de grains parasitaires, a été isolé par **Israel** en **1879** qui décrit l'aspect clinique de la maladie. Il s'agit d'un bacille anaérobie pour lequel **Wright** propose le binôme *Actinomyces bovis* et **Kruse** en **1896**, celui d'*Actinomyces israelii*.

La seconde période de **1900** à **1910** (**Mariat et Sebald, 1990**) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes dans le sol, avec les travaux de **Kraisky, Conn, Waksman et Curtis**, suivie de la période d'étude des caractères bactériologiques de ces microorganismes.

La dernière période s'attache aux antibiotiques produits par les actinomycètes. Elle commence en **1940** et le nom de **Waksman** lui est indiscutablement lié avec la découverte, en **1944**, de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (**Sanglier et Trujillo, 1997**).

L'objectif principal de notre étude consiste en l'isolement de souches d'actinomycètes productrices de substances à activité antibactérienne à partir d'écosystèmes inhabituels. Pour atteindre l'objectif fixé, il est nécessaire :

- d'utiliser des milieux de culture adéquat et des techniques d'isolement permettant de cultiver le plus grand nombre d'actinomycètes à partir d'échantillons provenant d'écosystèmes inhabituels (eaux de sebkha et de lacs pollués, sol de sebkha et de montagne et écorces d'arbres),

- étudier la diversité phylogénétique des souches actinomycétales isolées,

- sélectionner les souches productrices d'antibactériens par l'utilisation de différents milieux de production et des techniques différentes de mise en évidence de cette activité.

En fonction des résultats de ce criblage de base :

- des souches représentatives seront sélectionnées et identifiées au niveau de l'espèce par l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Cette identification sera complétée par l'identification moléculaire par amplification de l'ADNr 16S,

- une étude préliminaire des antibactériens produits par le choix du meilleur milieu de culture pour la production, l'extraction par différents solvants, la séparation des molécules bioactives par chromatographie sur papier, l'étude spectrale des antibactériens extraits par spectrophotométrie UV-Visible et HPLC et enfin l'étude de la stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de plusieurs paramètres.

Revue bibliographique

1- Résistance aux antibactériens

1-1 L'adaptation des bactéries à l'agression des antibactériens

L'adaptation des êtres vivants placés dans un environnement hostile est quantitative ou qualitative. Dans le premier cas, la réponse à une agression se traduit par une augmentation notable des moyens de défense et dans le deuxième cas par une sélection d'une réponse spécifique à l'agression.

1-1-1 Stratégie quantitative

Le monde bactérien, avec l'introduction des agents antibactériens, est confronté à une agression croissante. Pour contrebalancer cette agression, il doit s'adapter pour survivre. L'une des stratégies est d'augmenter la production d'enzymes inactivantes (β -lactamases, dihydrofolate réductase ou DHFR, dihydroptoréate synthétase etc.).

La stratégie de dissémination des β -lactamases au sein des populations bactériennes se fait grâce au gène *bla*, dont la transmission interbactérienne se fait par l'intermédiaire de transposons ou de plasmides. L'augmentation de la production de céphalosporinases dérégulées a été l'une des réponses du monde des bacilles à coloration de Gram négative aux oxyimino-céphalosporines qui sont faiblement hydrolysées par les β -lactamases à spectre large (TEM-1/2 et SHV-1, OXA-1/2). La résistance aux inhibiteurs de β -lactamases peut être due à l'hyperproduction enzymatique par la présence de multicopies plasmidiques ou par la diminution de la pénétration pariétale de ces antibiotiques. Cette hyperproduction de céphalosporinases au cours de traitements pose un problème thérapeutique majeur car c'est l'une des causes des échecs.

1-1-2 Stratégie qualitative

La stratégie qualitative repose sur la modification des cibles cellulaires (ribosomes, topoisomérases, protéines liant la pénicilline etc.) ou sur la modification de la qualité des armes de défenses (β -lactamases).

La stratégie des entérobactéries face à l'agression que représente les oxyimino-céphalosporines a été la production d'enzymes classiques communément appelés les β -lactamases à spectre élargi. La substitution d'un ou plusieurs acides aminés au niveau du site actif a permis une plus grande affinité pour ces céphèmes et pour l'aztrénam.

Blazquez et al., (1993) ont montré que les mutations pouvaient se faire à bas bruit et passer inaperçu en routine car les CMI pour ces molécules sont basses. Une seule mutation est probablement le point de départ. Ils ont émis l'hypothèse que l'ancêtre de TEM-3 qui a deux mutations en 102 (lysine) et en 236 (sérine) était la TEM-18 qui n'a que la mutation en 102.

La résistance à l'acide clavulanique est au tazobactam est due à une double mutation sur l'enzyme de type TEM-1. La méthionine en position 67 est remplacée par une isoleucine et la méthionine en position 180 est remplacée par une thréonine.

Cependant l'évolution moléculaire des β -lactamases est limitée par le nombre possible de mutations sans entraîner une inactivité de l'enzyme.

1-2 Epidémiologie de la résistance aux antibactériens

Au Etats-Unis d'Amérique (USA), la pneumonie communautaire acquise touche chaque année plus de quatre millions de personnes dont 20 % nécessitent une hospitalisation (**Kuti et al., 2002**). Les espèces les plus fréquemment isolées lors de ses infections sont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* (**Sutcliffe, 2003**). Trente quatre pour cent des *S. pneumoniae* isolées aux USA sont résistantes à la pénicilline, 32 % des *H. influenzae* sont résistantes à l'ampicilline et 91.5 % des *M. catarrhalis* sont résistants à la pénicilline et 15 % à l'érythromicine (**Sutcliffe, 2003**).

Par ailleurs, la vancomycine était l'antibiotique de choix pour le traitement des infections causées par *Staphylococcus aureus* méthicilline résistantes, jusqu'à l'apparition des premières souches résistantes, d'abord au Japon (**Hiramatsua et al., 1997**), puis aux USA (**CDC, 1997**) et en France (**Poly et al., 1998**). A cela s'ajoute la résistance de 50 % des *Enterococcus* à la vancomycine. Ces bactéries qui jusqu'en 1990 étaient considérés comme non pathogènes et en particulier *Enterococcus faecium* qui développe chez les patients sous traitement une résistance à plusieurs antibiotiques (**Auckland et al., 2002**).

Les premières souches de *Enterococcus faecium* résistants à haut niveau aux glycopeptides, vancomycine et teicoplanine, (ERG) ont été rapportées en France et au Royaume-Uni en 1987-1988, puis aux États-Unis en 1989-1990 où elles sont aujourd'hui endémiques et au 3ème rang des bactéries multirésistantes dans les unités de soins intensifs (**Leclercq et Coignard, 2006**). Dans ces unités, la proportion de souches

d'entérocoques résistantes à la vancomycine est passée de moins de 1 % en 1989 à 28 % en 2003 (CDC, 2004).

En 2002, l'*European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), a collecté les données concernant 49 400 épisodes d'infections invasives essentiellement des bactériémies : 6 747 à *S. pneumoniae*, 18 726 à *S. aureus*, 20 034 à *E. coli* et 3 893 à *Enterococcus* (Trystram1 et al., 2004). Comme le montrent les résultats publiés par EARSS (2002) le pourcentage de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline G (PSDP) était le plus élevé en France (53 %), devant la Roumanie (50 %), l'Espagne (33 %) et la Pologne (30 %). En revanche, ce pourcentage était inférieur à 5 % en Autriche, Danemark, Allemagne et la Hollande. Le pourcentage de pneumocoques résistants aux macrolides était aussi particulièrement élevé en France (58 %), juste derrière la Pologne (67 %) et devant la Belgique (34 %) et l'Italie (32 %). Il faut remarquer que la proportion de souches invasives de pneumocoque isolées chez des enfants de 0 à 4 ans était de 36 % (481/1337) en France mais seulement de 11 % (1700/15288) dans les autres pays pour la période 1999-2001.

En Algérie, le taux de résistance à la pénicilline G est d'environ 12,5 % (Smati et al., 1994). Les pourcentages de résistance à la méticilline chez *S. aureus* (SARM) étaient les plus élevés dans les pays du Sud de l'Europe (Grèce 44 %, Italie 38 %, Portugal 38 %, France 33 % Espagne 23 %), ainsi qu'en Grande-Bretagne (44 %), et en Irlande (42 %). En revanche, ces pourcentages étaient inférieurs à 5 % dans plusieurs pays du nord (Hollande, Danemark, Finlande, Suède). Comparés à 2001, les pourcentages de SARM en 2002 étaient demeurés identiques pour la France mais avaient augmenté (19 % à 22 %) pour l'ensemble des pays participants.

Environ 50 % des souches de *E. coli* étaient résistantes à l'ampicilline en France, comme globalement dans l'ensemble des pays participants à EARSS. En revanche, le pourcentage de souches de *E. coli* résistants à la ciprofloxacine était en France un peu plus bas (8 %) que la médiane de l'ensemble des pays (11 %) et nettement plus bas que dans certains pays : Portugal 23 %, Italie 21 %, Espagne 19 %, Allemagne 15 %.

Les pourcentages de résistance de haut niveau à la gentamicine chez *E. faecalis* et *E. faecium* étaient globalement élevés en Europe (médianes 37-38 %), excepté en France (10-15 %), Autriche (17-20 %) et Finlande (13 %). Enfin, le pourcentage de souches de *E. faecium* résistantes à la vancomycine était en France identique à la médiane européenne (2 %) mais beaucoup plus bas que dans certains autres pays : Italie 21 %, Grèce 19 % et Roumanie 17 %.

Plusieurs mécanismes de résistances sont impliqués dans la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux β -lactamines : production de β -lactamases, imperméabilité pariétale, modification des protéines liant la pénicilline (PLP).

Pseudomonas aeruginosa est résistant à de nombreuses β -lactamines. Même les céphalosporines dites antipycocyaniques, comme la ceftazidime. Cette résistance est due en partie à la faible perméabilité membranaire due à des porines, plus nombreuses, mais fonctionnelles (**Hancock, 1998**).

Le deuxième mode de résistance est une modification des protéines liant la pénicilline (PLP). Le mode de résistance le plus courant après l'imperméabilité membranaire est la production de β -lactamase.

George et al., en **1990** ont montré que l'utilisation importante de la ciprofloxacine a été associée à une baisse de sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Le nombre de souches pour lesquelles la ciprofloxacine avait une CMI ≤ 1 mg/l en 1985-1986 était de 98,6 % et de 86,3 % en 1989. Le nombre de souches de sensibilité diminuée (CMI : 2-4 mg/l) a augmenté de 1 % en 1985-1986 à 10,8 % en 1989.

Acar et Francoual, en **1990** ont montré que le nombre de souches de *Pseudomonas aeruginosa* devenues résistantes à la péfloxacin (CMI ≥ 4 mg/l) a augmenté de 20,1 % en 1984 à 33,4 % en 1989.

2- Actinomycètes

2-1 Définition et caractéristiques principales

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (**Eunice et Prosser, 1983**) constituées d'hyphes c'est-à-dire des filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et Prosser, 1983**). Cela explique leur dénomination « Actinomycetes ». Du Grec aktino, mycetes « champignons à rayons » ou champignons rayonnant. (**Gottlieb, 1973**).

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des *Actinomycetales* (**Mariat et Sebald, 1990**). Certains représentants de ces actinomycètes, surtout parmi les aérobies, ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (**Gazenko et al., 1998 ; Hirvonen et al., 1997**) et aussi de leur morphologie, parfois fungoïdes : filaments ramifiés, organes de sporulation etc... (**Becker et al., 1965 ; Reponen et al., 1998**).

Les bactériologistes considèrent les actinomycètes comme des bactéries tandis que les mycologistes les considèrent comme des champignons, (**Gottlieb, 1973**). Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (**Becker et al., 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981**). Leurs propriétés chimiques, physiologiques immunologiques, les rangent parmi les procaryotes (**Williams et al., 1973**). Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) et leur cytologie est celle des Bactéries (**Lechevalier et Lechevalier, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990**).

Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. Elles sont, pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens ; le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons (**Gottlieb, 1973**). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (existence d'espèces anaérobies strictes, sensibilité à des actinophages...) confirment leur classification parmi les bactéries (**Demain et Solomon, 1985 ; Mariat et Sebald, 1990**). Il s'agit d'un groupe supragénérique, rassemblant des bactéries très diverses dispersées dans la systématique (**Gottlieb, 1973**), où les genres *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium* ont des caractéristiques très rapprochées (**Mariat et Sebald, 1990**).

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive (**Williams et al., 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997**) dont le coefficient de Chargaff (G+C %) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % (**Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997**). Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés (0.5-1.0 μ m de diamètre) **Eunice, 1983**). Leur croissance, avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, est plus lente que celle des autres bactéries (**Ottow et Glathe, 1968 ; Larpent et Sanglier, 1989**). Sur les milieux solides, les actinomycètes forment en une semaine environ des colonies souvent pigmentées (gris, vert, rouge ...) provenant de l'accumulation d'hyphes ramifiés à contour lisse ou échancré à aspect compact, poudreux ou en chou-fleur.

En général, les actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique (**Ensign et al., 1993**). Certaines ont des exigences nutritionnelles tels que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tel que le charbon par pénétration mécanique de la matrice (**Crawford, 1993**) et peuvent dégrader les protéines, la cellulose

TABLEAU N° 1 : Répartition des actinomycètes dans la nature (Goodfellow ; 1983).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau , litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

et d'autres matières organiques comme la paraffine (**Hernandez-Coronado et al., 1997**) et les résidus des plantes dans le sol (**Lacey, 1997**).

Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Omura, 1992**).

2-2- Ecologie

Les actinomycètes colonisent une large variété d'habitats naturels. Comme le montre le **tableau N°1**, ils sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Elles sont présentes dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés à l'exception des espèces anaérobies appartenant aux genres *Actinomyces*, *Arachnia* et groupes voisins qui font partie de la flore endogène de **Veillon** et qui ne sont souvent dans la nature que dans les endroits récemment contaminés par l'homme (**Mariat et Sebald, 1990 ; Sanglier et Trujillo, 1997**). Par contre, ils semblent être absents des eaux minières très acides (pH<1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (**Xu, 1996 ; Hwang et al., 2001**).

Certaines espèces d'actinomycètes semblent préférer certains habitats à d'autres. Par exemple, les *Thermoactinomyces* et les *Faenia* se trouvent dans les composts, les foins en fermentation et les condenseurs de réfrigérateurs et de climatiseurs. Les *Actinoplanes* et les *Actinosynnema* se rencontrent dans les sols cultivés et sur les débris végétaux qu'on trouve aux bords des rivières et des lacs, les *Micromonospora* au fond des lacs et des réservoirs ; les *Streptosporangium* à la surface des sols forestiers, les *Microbispora* et les *Actinomadura* dans les sols cultivés. Les *Streptomyces*, si nombreux, se rencontrent presque partout. (**Xu, 1996 ; Lacey, 1997**).

Une majorité d'actinomycètes sont saprophytes, mais il existe des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Le sol, à partir duquel les actinomycètes peuvent coloniser de nombreux biotopes, en est le réservoir le plus riche (**Larpent et Sanglier, 1989 ; Xu, 1996 ; Katsifas et al., 1999**). Elles représentent une partie significative de la population microbienne du sol. D'après **Goodfellow et Williams 1983** elles sont présentes en nombre avoisinant le million par gramme ; **Waksman** a pu démontrer que le nombre des actinomycètes diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente (**Waksman, 1963**). Selon cet auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries

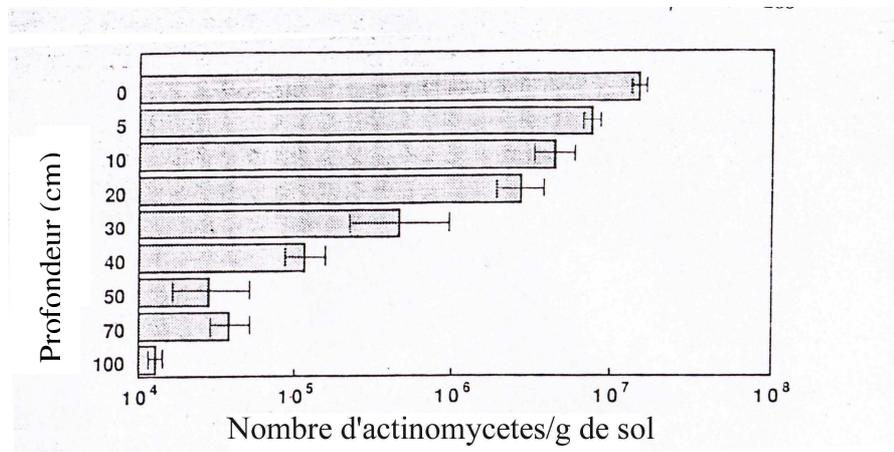


FIGURE N° 1 : Distribution verticale des actinomycètes dans le sol (moyenne de trois échantillons de sol) (Iwai et Takashi, 1992).

actinomycétales par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 16 à 40 % cela est confirmée par **Iwai et Takashi, 1992 (FIGURE N° 1)**.

Comme beaucoup de microorganismes du sol, de nombreux actinomycètes se comportent en bactéries mésophiles en laboratoire, avec une croissance maximale à une température variant de 25 à 30°C.

En ce qui concerne le pH, la plupart des actinomycètes sont des bactéries neutrophiles, leur croissance est comprise entre pH 5 et 9 avec un maximum autour de la neutralité. Comme la plupart des sols sont acides, le pH constitue évidemment un facteur important influençant leur distribution et leur activité. Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 ils ont donc une forte croissance dans les sols acides. Les Streptomycètes ont la particularité de produire des hydrolases et des chitinases qui exercent leur activité maximale à des pH acides (**Alexander, 1977**).

Il a été démontré que les actinomycètes possèdent une action importante dans la dégradation des polymères de structure relativement complexe, à savoir les hémicelluloses, la pectine, la kératine et la chitine. Ces produits apparaissent naturellement dans les litières en décomposition et dans les sols pour former l'humus. Leurs actions se situent également dans la dégradation des composts et des pollutions dues à l'activité de l'homme (**Lechevalier et al., 1973**).

La cellulose et la lignine sont les principaux résidus des plantes récalcitrantes à la dégradation. Des études réalisées par **Kuster en 1978**, démontrent formellement que les actinomycètes jouent un rôle significatif dans la dégradation de ces substances. Quelques *Streptomyces* attaquent la lignine et la cellulose en oxydant le cycle aromatique et la chaîne carbonée latérale en formant du CO₂. Par ailleurs, les genres *Micromonospora*, *Streptosporangium* et *Nocardia* sont cellulolytiques. Mais les actinomycètes sont plus lents à attaquer les polysaccharides que beaucoup de champignons et de vraies bactéries, et ne peuvent donc être de bons compétiteurs pour ces substrats (**Crawford, 1978**).

Les actinomycètes jouent un rôle prépondérant dans la fertilisation des sols (**Mariat et Sebald, 1990**). Elles ont un effet sur la structure du sol dans la liaison des particules argileuses grâce aux hyphes qui donnent une structure granuleuse viable ; ce qui améliore la production. Ainsi, le rôle de fixateurs d'azote au niveau des nodules des plantes non légumineuses pour le genre *Frankia* qui vit en association avec de nombreux arbres et arbrisseaux (**Ensign et al., 1993 ; Haansuu, 2002**).

Le système *Frankia*-plantes ligneuses fixe, globalement dans la biosphère, presque autant d'azote que le système *Rhizobium*-légumineuses. Les *Frankia* fixent aussi l'azote *in vitro*, tandis que les *Rhizobium* ne le font qu'*in planta* (Haansuu, 2002).

Dans la rhizosphère, les *Streptomyces* jouent un rôle important dans la protection des racines des plantes par inhibition du développement des champignons potentiellement pathogènes par leur sécrétion d'antibiotiques antifongiques, ce qui a été prouvé *in vitro*. (Watson et Williams, 1974).

Les actinomycètes isolés dans les eaux douces appartiennent le plus souvent aux genres *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Nocardia* et *Streptomyces*.

Les actinomycètes intéressent les hydrobiologistes qui les suspectent d'être les agents responsables des goûts et des odeurs terreuses qui apparaissent parfois dans les eaux de consommation. De nombreux composés volatiles complexes ont été isolés et caractérisés. Les plus fréquemment cités sont la géosmine, la mucidone et la 2-méthyl-isobornéol. Ce dernier composé peut donner à l'eau des odeurs, même à basse concentration (0.22 ppm) (Cross, 1981). Mais le fait que ces composés soient produits directement dans l'eau par les actinomycètes est discutable. En effet, à partir des travaux effectués dans les réservoirs naturels d'eau, Cross a émis l'hypothèse que ces composés seraient produits dans les sols environnants, puis entraînés dans les réservoirs par les infiltrations et les eaux de ruissellement. (Cross, 1981).

Les actinomycètes ont été également mentionnés dans les milieux marins (Woo et al., 2002). L'écologie des actinomycètes des mers et du littoral a été revue par Goodfellow et Williams en 1983. Il a été démontré que les actinomycètes constituent une petite partie de la flore totale ; leur nombre est faible comparé à leur présence dans les eaux douces ou les sols. Quelques chercheurs considèrent les actinomycètes marins comme une partie de la microflore indigène marine alors que d'autres les considèrent comme des survivants du lavage marin des sédiments et du littoral (Moore et al., 1999). Cette théorie est basée sur le fait que le nombre d'actinomycètes rencontrées dans l'eau de mer diminue avec la distance qui sépare le lieu de prélèvement de la côte (Okami et Okazaki, 1978 ; Xu, 1996).

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport (Gazenko et al., 1998 ; Reponen et al., 1998). Les spores de certains actinomycètes se développent dans des matériaux détériorés provoquant, lorsqu'elles sont inhalées, des maladies respiratoires. Les spores d'actinomycètes thermophiles sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air, lors de

manipulations de matériaux détériorés et leur dissémination se fait facilement grâce au mouvement de l'air (**Mazodier, 1974**).

2-3- Biologie du développement

Les actinomycètes se caractérisent par une diversité morphologique importante ; de simples bacilles diphtéroïdes (la plupart des mycobactéries) à des formes mycéliennes complexes (comme le genre *Streptomyces*) (**Gottlieb, 1973**). Cette variabilité morphologique s'accompagne souvent d'une différenciation importante avec un cycle biologique comparable à celui de certains Eucaryotes.

Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif) ou dans l'air au dessus du substrat (mycélium aérien). Les spores qui se développent à partir de l'un ou l'autre ou des deux à la fois assurent la propagation de la souche.

Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermés dans un sporange. D'autres actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de forme bactéroïde irrégulière, et enfin d'autres, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires au point d'être inexistantes. (**Mariat et Sebald, 1990 ; Lacey, 1997**).

La structure mycélienne des actinomycètes est typique, mais quelquefois transitoire (**Lopes et al., 1999**). Le mycélium rampant et/ou aérien subit une évolution complexe donnant naissance à des structures spécialisées, conidies ou sporanges, qui libèrent des spores de formes variées (**Ogata et al., 1992 ; Miguélez et al., 1993**).

2-3-1 Mycélium de substrat et mycélium aérien

Les actinomycètes possèdent une structure de procaryotes, mais un cycle biologique semblable à certains champignons (**Floyd et al., 1987 ; Sanglier et Trujillo, 1997**).

Le mycélium du substrat ou mycélium primaire (ou encore végétatif) se développe à partir du tube de germination des spores. La germination des spores comprend quatre étapes : l'activation ; l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance, pour lesquelles le degré hygrométrique joue un rôle important. Parfois, l'activation peut être déclenchée par un choc thermique, par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes*. Puis le tube de germination croît et donne des hyphes qui se ramifient de manière apicale, l'ensemble de la colonie se développant de manière radiale. Le mycélium ramifié forme des parois transversales, isolant les zones les plus âgées. C'est le cas des *Sporoactinomycetes*. Le

mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments. Cette aptitude de formation de mycélium du substrat montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (**Locci, 1976**). Dans la plupart des cas, les hyphes ont une élongation monopodiale mais la ramification dichotomique est observée chez les thermo-actinomycètes.

Chez les actinomycètes nocardioformes, le mycélium se fragmente en éléments dont chacun devient un centre de croissance. On retrouve cette fragmentation des hyphes pour des genres ne produisant que peu ou pas de spores. Par contre, dans d'autres genres, comme *Rhodococcus*, on ne peut pas parler de véritable mycélium primaire car on constate simplement la croissance d'une propagule originelle qui donne un filament, lequel se fragmente alors en petites unités.

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphes, dressés sur le mycélium du substrat. Ils sont souvent pigmentés et sont enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe. Une fois développé, le mycélium aérien couvre les colonies de surface en leur donnant un aspect poudreux, compact, poilu ou en chou-fleur. La production de mycélium aérien est influencée par plusieurs facteurs, notamment : la composition du milieu de croissance, la température d'incubation et la présence de composés stimulant spécifiquement le mycélium aérien (**Pine, 1970**).

Généralement le mycélium aérien est plus épais et moins ramifié que le mycélium du substrat qui est hydrophobe. Le mycélium du substrat est aérobic facultatif. Par contre, le mycélium aérien est aérobic strict (**Silvey et Roach, 1975**).

Les actinomycètes aquatiques sont habituellement dépourvus de ce type de croissance (mycélium aérien) (**Moore et al., 1999**).

Le mycélium aérien n'est pas une spécificité des actinomycètes qui possèdent le mycélium végétatif. En effet, le genre *Sporichthya* n'a qu'une croissance aérienne.

2-3-2 Structures particulières

Les sclérotés que l'on retrouve chez les espèces du genre *Chainia* sont formés d'une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés.

Les synnemata ou corémies correspondent aux assemblages compacts d'hyphes dressés qui fusionnent parfois et qui portent des conidies latérales. Les corémies définissant aussi des colonnes d'hyphes caractéristiques du genre *Actinosynnema* ou bien des vésicules, différentes des spores, chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium*.

2-3-3 Formation des spores

Les différents groupes d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certains hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores hautement résistantes à la chaleur et autres adversités.

- Les endospores

Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*.

Dans ce groupe, une subdivision supplémentaire est réalisée en fonction du mode de formation de la nouvelle paroi (Locci et Sharples, 1984). On parle ainsi de « sporulation entérothallique », caractéristique des genres *Planomonospora* et *Dactilosporangium*, lorsque la nouvelle paroi se forme entre la membrane cytoplasmique et la paroi de l'hyphe parentérale.

On parle de « sporulation holothallique », caractéristique du genre *Thermoactinomyces*, lorsque la nouvelle paroi qui délimite la spore provient, au moins en partie, de toutes les couches pariétales de l'hyphe parentérale, recouverte ou non d'une enveloppe.

Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles et sont semblables, morphologiquement et chimiquement, à celles des *Bacillaceae*. Elles contiennent une paroi externe épaisse, multicouche et résistante, qui enveloppe le cortex, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes et le nucléoïde. Elles contiennent aussi de l'acide dipicolinique. Les actinomycètes du genre *Thermoactinomyces*, qui les produisent sur leurs hyphes, semblent être proches parents de ce groupe bactérien.

- Les exospores

Elles naissent de la formation de parois transversales à partir des hyphes existantes. Une subdivision supplémentaire est également réalisée selon la présence ou l'absence d'une enveloppe qui recouvre la paroi de l'hyphe sporogène.

Ainsi, la formation d'exospores par fragmentation d'hyphes avec enveloppe est la plus fréquente et se retrouve notamment chez *Actinoplanes* et *Streptomyces*. La formation d'exospores par fragmentation d'hyphes du substrat sans enveloppe se rencontre avec *Micromonospora*.

Les conidies peuvent, suivant les groupes, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), et/ou en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (*Streptoverticillium*).

Ces exospores contiennent la plupart des éléments du mycélium primaire :

- Un seul nucléoïde correspondant à un seul génome haploïde pour les spores de *Streptomyces*. Le contenu du génome des exospores est plus riche en ADN mais moins en ARN que celui du mycélium du substrat.
- Des ribosomes dissociables en sous-unités 30 S et 50 S.
- Un système membranaire intracytoplasmique.
- Des vacuoles.
- Une membrane cytoplasmique.
- Une paroi plus épaisse qui peut contenir jusqu'à trois couches auxquelles peuvent s'ajouter des éléments externes.

Ces exospores ne contiennent pas d'acide dipicolinique mais des quantités plus importantes de potassium, calcium et manganèse que dans le mycélium du substrat. Elles englobent aussi souvent des pigments. Leur contenu en tréhalose, relativement abandon, aurait un rôle dans la dormance et la résistance des spores (**Mc Bride, 1986**).

2-4- Taxonomie

La taxonomie est l'étude de la diversité des microorganismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle recouvre trois domaines différents : la classification, la nomenclature et l'identification.

La classification établie des groupes taxonomiques (taxon). Ceux-ci sont établis selon des critères phénotypiques et moléculaires à défaut de bases phylogéniques.

La nomenclature affecte un nom à ces groupes selon un système binomial découlant des lois de **Linné** dans lequel un nom latin de genre précède le nom de l'espèce.

L'identification assigne les souches inconnues à l'un des taxons décrits.

A ses débuts, la taxonomie bactérienne, suivant les règles édictées pour la classification des organismes supérieurs (végétaux, animaux) s'est appuyée sur l'étude du phénotype exprimé et sur les variations morphologiques existants entre les bactéries. Cependant, s'il est facile pour les organismes supérieurs de délimiter une espèce par la barrière de fécondité et la description morphologique, il n'est pas de même chez les bactéries. En effet, se sont des organismes très peu différenciés et ne présente pas de

phénomènes sexués faisant intervenir un échange complet de matériel génétique. De ce fait, une espèce en microbiologie est constituée par sa souche type et par l'ensemble des souches considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluses au sein de la même espèce. Les critères permettant d'apprécier la parenté de différentes souches ont varié dans le temps et il est possible de distinguer plusieurs périodes au cours desquelles ont été utilisées une taxonomie phénétique, une taxonomie numérique, une chimiotaxonomie, une taxonomie phylogénétique et une taxonomie polyphasique encore qualifiée de "mixte et consensuelle" (polyphasic taxonomy). La définition de l'espèce diffère selon les critères retenus pour apprécier la similitude des souches ce qui a conduit à constituer des comités internationaux chargés de définir les critères et de proposer une définition de l'espèce (**Stackebrandt et al., 2002 ; Wayne et al., 1987**).

2-4-1 Taxonomie phénétique

Les premières classifications bactériennes basées sur la comparaison de critères morphologiques datent de la fin du XIX^{ème} siècle. Jusqu'au début des années 1960, la définition d'une espèce, et d'une manière générale toute la taxonomie bactérienne, reposait sur une classification phénétique ou phénotypique. Cette classification utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la mise en évidence d'un caractère biochimique jugé essentiel, l'habitat, le pouvoir pathogène etc. Le choix des critères qualifiés "d'importants" est subjectif et il peut varier d'un auteur à un autre. De nombreux auteurs se sont intéressés à la classification des actinomycètes et plus particulièrement à celle du genre *Streptomyces*, premier genre isolé à partir du sol et présentant des particularités intéressantes du point de vue thérapeutique.

Pridham et al., 1956 divisent les Streptomycetes en sept groupes, en fonction de la sporulation et de la pigmentation du mycélium aérien. D'autres auteurs répartissent ce genre en nombre de séries, basées sur la pigmentation du mycélium primaire et la sporulation. **Pridham et Lyon, 1976** classent les Streptomycetes selon la morphologie des sporophores et la couleur du mycélium aérien. **Waksman** utilise un plus grand nombre de critères qui sont la morphologie des spores, la couleur du mycélium aérien et végétatif, la formation de pigments chromophores et les propriétés biochimiques (**Delhomme, 1974**). Ces critères sont également ceux de **Shirling et Gottlieb (1966)** mais pris dans un ordre différent, à savoir la couleur des mycéliums, la présence de sporophores et la forme des spores.

2-4-2 Taxonomie numérique

En 1763, le botaniste français **Adanson** proposait une méthode de classification qui tenait compte de l'ensemble des caractères d'un organisme. A la fin des années 1950, suite au développement des techniques biochimiques analytiques, **Sneath** applique une méthode similaire aux bactéries et développe une taxonomie qualifiée de numérique ou d'adansonienne. De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques etc. et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendogrammes, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables.

Les caractères métaboliques et physiologiques sont dès lors largement employés en taxonomie, même s'il est bien connu que ces caractères peuvent être différents pour des souches d'une même espèce. Cette variabilité peut être expliquée aujourd'hui par les transferts de plasmides et les transferts de gènes *via* les phénomènes de parasexualité tels que la conjugaison, la transformation et la transduction qui sont connus chez les procaryotes, et qui passent la barrière d'espèce, voire même de domaine (**Nelson et al., 1999**). Les cas d'échanges de gènes métaboliques ou de gènes impliqués dans l'adaptation à l'environnement ont été rapportés. Pour les actinomycètes cette approche taxonomique a été utilisée par **Williams et al.** en 1983, **Kämpfer et al.** en 1991 **Kim et al.** en 1996.

2-4-3 Chimiotaxonomie

La chimiotaxonomie est un système de classification et d'identification basé sur des caractères chimiques permettant de grouper et de distinguer des microorganismes. Ces déterminations chimiques se montrent surtout efficaces pour délimiter des groupes et des genres. L'examen des acides aminés de la paroi cellulaire, des glucides, des lipides et des acides nucléiques constituent les principaux caractères utilisés en chimiotaxonomie (**O'donnell, 1982, O'donnell et al., 1985**). Cette approche taxonomique a permis une grande avancée dans la classification des actinomycètes.

L'étude de la composition de la paroi cellulaire des actinomycètes montre qu'elle ne renferme ni chitine, ni cellulose, mais qu'elle est composée soit d'une :

- Glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'homme et des animaux, illustrées par le genre *Actinomyces* (**Lechevalier et Lechevalier, 1985**).

TABLEAU N°2 : Distribution du type du radical acétyle de l'acide muramique au sein des actinomycètes

Type d'acétyle	Taxon
Acide N-Glycolylmuramique	<i>Mycobacterium, Nocardia Rhodococcus, Actinoplanes, Amorphosporangium, Ampullariella, Dactylosporangium, Micromonospora, Corynebacterium</i>
Acide N-Acetylmuramique	<i>Actinomadura, Oerskovia, Streptomyces, Corynebacterium</i>

TABLEAU N°3 : Classification des peptidoglycanes des actinomycètes d'après **Rogers et Becker (1980)**.

Position de la liaison interpeptidique	Pont peptidique	Aminoacide en position 3
Peptidoglycane A Liaison interpeptidique en position 3 et 4.	1- Liaison simple	α L-Lysine β L- ornithine γ Acide meso-diaminopimélique
	2- Polymère peptidique 3- L-acide aminé monocarboxylique ou glycine ou oligopeptides	α L-lysine α L-lysine β L-ornithine γ Acide LL-diaminopimélique
	4- Contient un acide aminé dicarboxylique	α L-lysine β L-ornithine γ Acide méso-diaminopimélique δ Acide L-diaminobutyrique
	Peptidoglycane B Liaison interpeptidique en position 2 et 4.	1- Contient un L-amino acide
2- Contient un D-amino acide		α L-ornithine L-homoserine Acide L-diaminobutyrique

- Glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide diaminopimélique DAP ; ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, tels que les *Streptomyces*.

Le peptidoglycane des actinomycètes est constitué sur le même modèle que celui des autres bactéries. En effet, il y a alternance des unités glucosamines et de l'acide muramique, liées par des liaisons (1-4) (**Kandler, 1970**).

Les chaînes des glycanes sont reliées entre elles par des sous-unités peptidiques dont la composition en acides aminés est variable ainsi que les liaisons entre ces acides aminés, ce qui explique l'existence de différents peptidoglycanes chez les actinomycètes. En dépit de l'uniformité générale du glycane, des structures atypiques ont été signalées, notamment le remplacement de l'acide N-acétylmuramique par l'acide N-glycolmuramique (CH₃-CO- remplacé par OHCH₂CO-) voir **Tableau N°2 (Kandler, 1970)**.

- Composition en aminoacides

L'alternance des acides aminés de la forme L et D dans la séquence térapeptidique du peptidoglycane renforce la dureté de la paroi (les hétéropolymères sont plus solides que les homopolymères). Cette structure permet aux acides aminés de s'aligner de telle sorte que les liaisons hydrogènes ne peuvent pas se former. De plus, la présence des acides aminés de la forme D et l'absence d'acides aminés aromatiques rendent le peptidoglycane inattaquable par les L-protéase. Le **Tableau N°3** résume les critères de classification des différents peptidoglycanes des actinomycètes d'après **Rogers et Becker (1980)**.

- Composition en sucres

Les glucides de la paroi ou de l'hydrolysats cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs (**Lechevalier, 1968**). Le **spectre de sucre A** (arabinose, galactose) est caractéristique de la grande majorité des nocardioformes (*Nocardia*, *Saccharopolyspora*). Le **spectre glucidique B** (madurose, 3-O-méthyl-D-galactose) est présent chez les maduromycetes (*Actinomadura*, *Streptosporangium*). Les streptomyces et apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (**spectre C**). Il en est de même chez les *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (**spectre D**) est caractéristique du type principal des actinoplanetes (*Actinoplane*, *Micromonospora*). La combinaison du type d'acide aminé du

TABLEAU N°4 : Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois cellulaires des actinomycètes (**Lechavalier et Lechevalier, 1970**).

Types de parois	Constituants majeurs	Exemple de genres
I	LL-DAP ^a	<i>Streptomyces</i>
II	Méso ou hydroxy-DAP ^a Glycine, xylose, arabinose	<i>Micromonospora</i>
III	Méso-DAP ^a , madurose ou aucun sucre	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP ^a , arabinose, galactose	<i>Nocardia</i>
V	Lysine, ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB ^b , glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

^a) Ac. 2,6-diaminopimélique ; ^b) Ac. 2,4-diaminobutirique.

peptidoglycane et du spectre de glucides permet un classement en groupes principaux. (Tableau N°4) (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

- Composition en lipides

Les lipides important en taxonomie peuvent être divisés en trois groupes :

- Les acides gras :

Les acides gras qui constituent la paroi des actinomycètes sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, des molécules saturées ou insaturées avec la présence éventuelle de groupes cyclopropane. Les plus communs chez les actinomycètes appartiennent soit à un groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre (*Nocardia* : 46 à 60).

- Les ménaquinones :

Elles sont classées en fonction du nombre d'unités isoprènes et du nombre de doubles liaisons. Dans le groupe des genres dont les parois contiennent du LL-DAP, le genre *Nocardioides* se caractérise par du MK-8(H4) alors que le genre *Streptomyces* synthétise principalement du MK-9(H6). Le genre *Thermoactinomyces* est caractérisé par la présence de MK-7.

- Les lipides polaires :

Les lipides polaires les plus communs chez les actinomycètes sont les phospholipides.

2-4-4 Taxonomie moléculaire

Longtemps, les aspects morphologiques, microscopiques, couplés à quelques caractères physiologiques ont été les seuls critères utilisables pour classer les actinomycètes. Il a fallu attendre la deuxième moitié du 20^{ème} siècle pour que les outils nécessaires au développement d'une telle taxonomie soient disponibles. Au-delà de la détermination du GC % et les hybridations ADN-ADN, les techniques d'amplification et de séquençage ont permis de franchir une étape cruciale pour la taxonomie moderne des actinomycètes. Plusieurs régions du génome ont fait l'objet d'études.

- Détermination du G + C %

En 1949, Chargaff *et al.*, montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier d'un individu à un autre mais était constant pour

TABLEAU N°5 : Valeur du coefficient de Chargaff pour les différents genres d'actinomycétales (**Jacque, 1985**)

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

les individus d'une même espèce. Le contenu en base d'un ADN est exprimé par le G+C %. Chez les bactéries, cette valeur est très dispersée et varie de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des microorganismes dont les G+C% diffèrent de plus de 5% ne peuvent appartenir à une même espèce, et que des microorganismes dont le G+C% diffèrent de plus de 10% ne peuvent appartenir au même genre. Bien entendu, des valeurs identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être distribuées de manière très différente sur l'ADN.

Les actinomycètes sont des procaryotes dont le coefficient de Chargaff est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % (**Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun *et al.*, 1997**). Le **tableau N°5** regroupe les différentes valeurs de GC rencontrées dans le groupe des actinomycétales.

- Les hybridations d'acides nucléiques

Les hybridations ADN/ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne. Leurs réalisations n'ont été possibles qu'après la découverte du phénomène de renaturation de l'ADN (**Marmur et Doty, 1962**). Les méthodes d'hybridation ADN/ADN sont basées sur le fait que deux molécules d'ADN dénaturées peuvent se réassocier à condition de présenter une homologie. La renaturation est réalisée à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former :

- . Si les ADN des deux bactéries présentent des homologies importantes, il se produit d'abord un appariement étroit au niveau d'un segment qui porte des bases complémentaires (site de nucléation), puis le duplex se complète de proche en proche comme dans le cas d'une fermeture à glissière.

- . Si les ADN des deux bactéries ont des séquences très différentes, il peut se produire un appariement au niveau de quelques bases complémentaires situées dans une zone limitée, mais le reste des fragments ne s'associe pas ou seulement par quelques liaisons hydrogène éparses.

Cette technique présente plusieurs avantages :

- . elle est applicable à toutes les espèces cultivables,
- . les résultats ne sont pas ou peu affectés par les mutations ou par la présence de plasmides,
- . elle porte sur l'ensemble du génome (plasmides exceptés).

Une espèce est définie phylogénétiquement comme l'ensemble des souches ayant des valeurs d'hybridation ADN/ADN supérieures ou égales à 70 % et des valeurs de ΔT_m inférieures ou égales à 5°C (T_m : melting temperature, c'est la température de demi-dénaturation d'un homo ou d'un hétéroduplex d'ADN ; ΔT_m : différence de T_m entre l'hybride homologue et l'hybride hétérologue). Les techniques d'hybridation ont également été appliquées à l'hybridation ADN-ARNr. L'hybridation ADN-ARNr a été employée pour placer des procaryotes dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce. Elles ont permis de dégager le concept de superfamille, terme proposé par **De Ley** pour rassembler des taxons à un niveau supragénérique. Les hybridations ADN-ARNr ont été remplacées par le séquençage des ADNr 16S. Cette méthode a été employée entre autres par **Witt et Stackebrandt** en **1990** pour unifier le genre *Streptovercillium* avec le genre *Streptomyces*, **Labeda** pour la systématique des *Streptomyces* en **1992**.

- Etude de l'ARN 16S

En **1980**, **Kimura** a émis le concept d'horloge "évolutionnaire" : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Comme le souligne **Woese et Fox** en **1977**, l'évolution à un rythme quasi indépendant des changements de phénotypes (théorie neutraliste de l'évolution). Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique ou phylogénétique en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles. Le gène codant l'ARN ribosomal 16S a été le premier et le plus complètement exploré. Les ARNr étant essentiels à la bactérie et ayant un rôle fonctionnel identique pour tous les ribosomes, leur structure évolue très lentement au cours du temps, vraisemblablement en raison de leur rôle critique et constant dans la physiologie bactérienne. Le gène codant l'ARN ribosomal 16S présente ainsi à la fois des régions hautement conservées tout en contenant de courtes séquences signature spécifiques de genre et parfois d'espèces. Ces caractéristiques particulières font de ce gène une cible intéressante. La généralisation de l'analyse des séquences d'ADNr 16S a incité les auteurs à corréler les pourcentages d'identité entre séquences d'ADNr 16S et les pourcentages de réassociations ADN/ADN. Il a ainsi été mis en évidence que des séquences d'ADNr 16S ayant des similarités inférieures à 97% ne correspondaient jamais à des pourcentage de réassociation ADN/ADN supérieurs à 60% (**Stackebrandt et Goebel, 1994**). Par extension, il est généralement admis que des séquences partageant moins de 97% de similarité correspondent à des espèces différentes. Le pouvoir résolutif de l'ADNr 16S, a priori

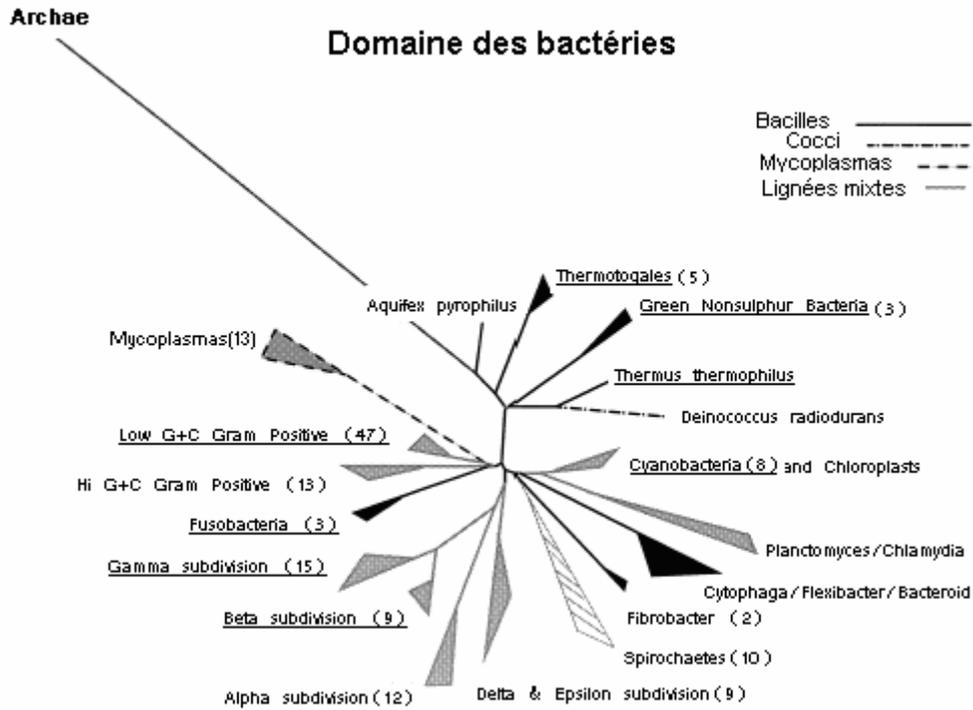


Figure 3 :Arbre phylogénétique du domaine des bactéries construit à partir des séquences de 16S rRNA de la base de données de l’RDP (Ribosomal Database Project). Les différentes branches sont codées comme indiqué sur la figure. Les lignées qui sont soulignées incluent les formes filamenteuses. Le nombre d'espèces étudiées pour chaque branche est indiqué entre parenthèses.

suffisant pour séparer des espèces différentes, ne permet pas toutefois de regrouper des espèces identiques. Si le pourcentage de similarité des ADNr 16S de deux souches est égal ou supérieur à 97, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN/ADN. Dès lors, la définition d'espèce ne peut être basée uniquement sur la base de similarité de séquences d'ADNr 16S ou même d'autres gènes (**Rossello Mora et Amann, 2001**). Cette technique a largement contribué dans la classification et l'identification des bactéries actinomycétales (**Chun et Goodfellow, 1995 ; Embley et Stackebrandt, 1994 ; Kataoka et al., 1997; Laurent et al., 1999**).

- Phylogénie des actinomycètes

Les microorganismes ont été traditionnellement classés selon des caractères tels que la morphologie, la physiologie etc., ce qui ne permettait pas d'établir des relations phylogénétiques entre les différents groupes microbiens. L'introduction de la phylogénie basée sur l'analyse de séquences d'acides nucléiques en systématique microbienne a permis une classification des microorganismes en terme d'évolution et une clarification des lignées phylogénétiques entre elles et des niveaux taxonomiques c'est-à-dire espèces, genres, familles etc. (**Pace, 1997**). De plus, les travaux de phylogénie moléculaire sont à l'origine d'une avancée scientifique majeure datant de la fin des années **1970** : la découverte par **Carl Woese** des *Archae*, troisième domaine du vivant avec les *Eucarya* et *Bacteria* (**Woese et Fox, 1977**).

Les bactéries à coloration de Gram positive forment un des dix groupes supragénériques majeurs, cet ensemble étant réparti en deux branches principales en fonction de la composition en bases de leur ADN. La branche des actinomycètes est composée de bactéries dont l'ADN est riche en guanine (G) et cytosine (C), (GC % > 55) (**FIGURE N°2**).

2-4-5 Taxonomie mixte et consensuelle (polyphasic taxonomy)

Les termes de "polyphasic taxonomy" ont été introduits en **1970** par **Colwell** pour faire référence à une classification qui tient compte d'un maximum de données (génétiques, phénotypiques, chimiotaxonomiques, écologiques...). En effet, aucun des critères utilisé isolément n'est suffisamment discriminant pour classer les taxons les uns par rapport aux autres. De nos jours, l'expression "polyphasic taxonomy" sous-entend également que cette classification est susceptible d'avoir l'agrément d'un maximum de bactériologistes d'où la traduction "taxonomie mixte et consensuelle" La

définition d'une espèce, telle quelle est donnée par le Comité présidé par **Wayne** puis reprise par le Comité présidé par **Stackebrandt**, repose entre autres sur la comparaison des critères phénotypiques, des séquences d'ADNr 16S et se base sur la valeur seuil des 70% d'homologie ADN/ADN. Selon le comité, la description d'une nouvelle espèce devrait reposer sur la description de plusieurs souches et le développement de nouvelles techniques est recommandé telles que : le séquençage de gènes différents, en particulier de gènes codant pour des protéines du métabolisme, afin de vérifier la cohérence génomique d'un cluster ; le séquençage de l'espace intergénique 16S-23S ; l'analyse électrophorétique des protéines etc.

Une revue récente propose de définir l'espèce comme étant "un cluster monophylétique et génomiquement cohérent d'organismes individuels présentant un niveau de similitude globalement élevé pour de nombreuses caractéristiques indépendantes, et détectable par une propriété phénotypique discriminante" (**Rossello Mora et Amann, 2001**).

En dépit de ces efforts, il convient de remarquer qu'il n'existe actuellement aucune définition universellement admise de l'espèce bactérienne, la notion d'espèce chez les procaryotes relèverait plutôt de l'ordre du concept (**Stackebrandt, 2003**).

2-5- Classification

En **1948** dans la **6^{ème} Edition du Bergey's manual** trois familles (*Mycobacteriaceae*, *Actinomycetaceae* et *Streptomycetaceae*) avec **126 espèces** ont été décrites dans la classe des *Shizomycetes* et l'ordre des *Actinomycetales*. Dix années plus tard les actinomycètes dans la **7^{ème} Edition du Bergey's manual** sont divisées en quatre grandes familles : la famille *Actinoplanaceae* avec toutes ses espèces à sporanges, la famille des *Mycobacteriaceae* avec ses bactéries « vraies », la famille *Actinomycetaceae* formée de la plupart des espèces pathogènes, anaérobies et capables de se fragmenter et enfin la famille *Streptomycetaceae* regroupant les espèces filamenteuses produisant des spores libres (spores individuelles, ou en chaîne, incluant le genre *Thermoactinomyces*). Cette classification traditionnelle a été profondément remaniée avec l'apparition de la chimiotaxonomie au cours des années 70 pour donner naissance en **1974** à la classification proposée dans la **8^{ème} Edition du Bergey's manual of determinative bacteriology**. La différenciation en divers groupes a vu le jour avec la formation de huit familles dont les plus importantes sont la famille des *Actinoplanaceae* incluant toutes les espèces à sporanges avec 37 espèces (y compris le genre *Kitasatoa*), la famille des *Streptomycetaceae* comportant entre autres le genre *Streptomyces* avec ses 463 espèces et

formant ainsi la plus grande famille avec 508 espèces. Tous les genres produisant des spores individuelles et les genres apparentés sont placés dans la famille *Micromonosporaceae* y compris le genre *Thermoactinomyces*. En **1989 le Bergey's manual of systématique bacteriology** a consacré tout le volume 4 aux actinomycètes, ainsi ces bactéries sont rattachées au **règne** des Procaryotes, à la **division** des Firmicutes et à la **classe** des *Thalobacteria* contenant l'**ordre** des *Actinomycetales*. Sans considérer les Actinobacteria, cet ordre comprend 9 groupes et environ **40** genres (**Tableau N°6**). La tendance à la ramification du mycélium et un **G + C %** supérieur à **55 %** sont les propriétés communes les plus significatives de ces bactéries à Gram positif.

Jusqu'à présent pour classer un organisme dans la classe des Actinobacteria on s'appuyait sur :

- la chimiotaxonomie qui détecte les différences dans la composition chimique des constituants de la paroi tels que le peptidoglycane, les lipides polaires et les acides gras, les ménaquinones, les cytochromes, et la composition de l'ADN ;

- les techniques de réassociation ADN-ADN qui permettent de calculer les similitudes entre les brins simples d'ADN des espèces étroitement liées (**Stackebrandt et Kandler, 1979**);

- la détermination des similitudes entre les séquences de l'ARNr 16S ou l'ADNr 16S, qui indique l'ampleur de la variation et a tout les niveaux entre les séquences des souches les plus proches (**Stackebrandt et al., 1980**).

Chacune de ces dernières approche a contribué au succès d'une stratégie de classification qui s'est nommée polyphasique par **Colwell (Colwell, 1970)**.

Bien que les méthodes appropriées aient été disponibles pendant des décennies, cela a pris environ 30 ans pour réaliser une vue d'ensemble et complète sur les actinomycètes mais sans arrivé à une proposition d'un système unifié de classification. Parmi les diverses raisons, la plus évidente est l'introduction tardive de l'analyse des séquences 16S ARNr/ADN qui permet plus que n'importe quelle autre méthode taxonomique d'établir un groupement phylogénétique des organismes actinomycétiques. Avec ses méthodes les bactéries du genre *Streptoverticillium* ont été transférées vers le genre des *Streptomyces* (**Witt et Stackebrandt, 1990**), et certaines bactéries du genre *Nocardiosis* ont été transférées vers un nouveau genre *Sacharothrix* (**Labeda et al., 1984**). Pour toute ses considérations **Stackebrandt et al., (1997)** ont proposé une nouvelle hiérarchie de classification de la classe des *Actinobacteria* basée uniquement sur l'analyse des séquences 16S ARNr. Cette classe est formée de la sous classe *Actinobacteridae*, comprenant plusieurs ordres dont l'ordre *Actinomycetales* et dix sous

TABLEAU N°6 : Principaux groupes et genres d'actinomycètes (Actinobactéries non incluses) (Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 4, 1989)

Groupe/Genre	Type de Paroi	Spectre Des Glucides	Acides Gras	Ménaquinones Majeures (MK)	Type de Phospholipides	G+C%
ACTINOPLANETES						
<i>Actinoplanes</i>	II	D	2d	-9(H ₄), - 10(H ₄)	PII	72-73
<i>Ampullariella</i>			2d	-9(H ₄), - 10(H ₄)	PII	72-73
<i>Catellatospora</i>			ND	-9(H ₄), - 10(H ₈)	PII	71-72
<i>Dactylosporangium</i>			3b	-9(H ₄ ,H ₆ , H ₈)	PII	71-73
<i>Micromonospora</i>			3b	-9(H ₄), - 10(H ₄)	PII	71-73
<i>Pilimelia</i>			2d	-9(H ₂), - 9(H ₄)	PII	ND
MADUROMYCETES						
<i>Actinomadura pusilla</i>	III	B, C	3c	-9(H ₀ ,H ₂ ,H ₄)	PIV	64-69
groupe		B, C	3c	-9(H ₆ ,H ₂ ,H ₄)	PIV	67-74
<i>Microbispora</i>		B, C	3c	-9(H ₀ ,H ₂ ,H ₄)	PIV	66
<i>Microtetraspora glauca</i>		B	3c	-9(H ₂ ,H ₄)	PIV	70-71
groupe		B	3c	-9(H ₂)	PIV	72
<i>Planobispora</i>		B	3c	-9(H ₂ ,H ₄)	PIV	69-71
<i>Streptosporangium</i>						
MICROPOLYSPORAS						
<i>Actinopolyspora</i>	IV	A	2c	-9(H ₄ ,H ₆)	PIII	64
<i>Amycolata</i>			3e	-8(H ₄)	PIII	68-72
<i>Amycolatopsis</i>			3f	-9(H ₂ ,H ₄)	PII	66-69
<i>Faenia (Micropolyspora)</i>			2c	-9(H ₄)	PIII	66-71
<i>Kibdelosporangium</i>			3c	ND	PII	66
<i>Pseudonocardia</i>			2b	-8(H ₄)	PIII	79
<i>Saccharomonospora</i>			2a	-9(H ₄)	PII	69-74
<i>Saccharopolyspora</i>			2c	-9(H ₄)	PIII	77
ACTINOMYCETES AVEC SPORANGES MULTILOCAIRES						
<i>Frankia</i>	III	B, C, E	1	ND	PI	66-71
<i>Geodermatophilus</i>	III	C	2b	-9(H ₄)	PII	73-76

TABLEAU N°6 : Principaux groupes et genres d'actinomycètes (Actinobactéries non incluses) (**Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 4, 1989**) suite.

Groupe/Genre	Type de Paroi	Spectre Des Glucides	Acides Gras	Ménaquinones Majeures	Type de Phospholipides	G+C%
NOCARDIOFORMES						
<i>Caseobacter</i>	IV	A	1b	-8(H ₂), -9(H ₂)	ND	65-67
<i>Corynebacterium</i>			1a	-8(H ₂), -9(H ₂)	PI	51-63
<i>Mycobacterium</i>			1b	-9(H ₂)	PII	62-69
<i>Nocardia</i>			1b	-8(H ₂), -9(H ₂)	PII	64-72
<i>Rhodococcus</i>			1b	-8(H ₂), -9(H ₂)	PII	63-72
NOCARDIOIDES						
<i>Nocardioides</i>	I	-	3a	-8(H ₂)	PI	ND
STREPTOMYCETES						
<i>Intrasporangium</i>	I	-	1a	-8	PI	ND
<i>Kineosporia</i>			ND	-9(H ₄)	PIII	ND
<i>Sporichthya</i>			3a	-9(H ₆ , H ₈)	ND	69-78
<i>Streptomyces</i>			2c	-9(H ₆ , H ₈)	PII	69-73
<i>Streptoverticillium</i>			2c	-9(H ₆ , H ₈)	PII	
THERMOMONOSPORA						
<i>Actinomadura madurae</i> groupe	III	B	3a	-9(H ₆)	PI	66-69
<i>Actinosynema</i>		C	3f	-9(H ₄), -10(H ₄)	PII	71-73
<i>Microtetraspora viridis</i>		C	3a	-9(H ₄)	PI	67
<i>Nocardiopsis</i>		C	3d	-10(H ₂ , H ₄ , H ₆)	PIII	64-69
<i>Saccharothrix</i>		C	3f	-9(H ₄), -10(H ₄)	PII	70-76
<i>Streptoalloteichus</i>		C	ND	-9(H ₆), -10(H ₆)	ND	ND
<i>Thermomonospora</i>		{ C C	{ 3e 3c	{ -10(H ₄ , H ₆) -9(H ₂ , H ₄)	PII PIV	ND ND
AUTRES GENRES						
<i>Glycomyces</i>	II	D	2c	-9(H ₄), -10(H ₄)	PI	71-73
<i>Kitasatosporia</i>	I, III	C	ND	ND	ND	66-73
<i>Spirillospira</i>	III	B	3a	-9(H ₄ , H ₆)	PI, PII	69-71
<i>Thermoactinomyces</i>	III	C	2b	-7, -9	ND	53-55

Class *Actinobacteria*

Subclass *Acidimicrobidae* Order *Acidimicrobiales* Family *Acidimicrobiaceae*
 Subclass *Rubrobacteridae* Order *Rubrobacterales* Family *Rubrobacteraceae*
 Subclass *Coriobacteridae* Order *Coriobacterales* Family *Coriobacteriaceae*
 Subclass *Sphaerobacteridae* Order *Sphaerobacterales* Family *Sphaerobacteraceae*
 Subclass *Actinobacteridae* Order *Actinomycetales*

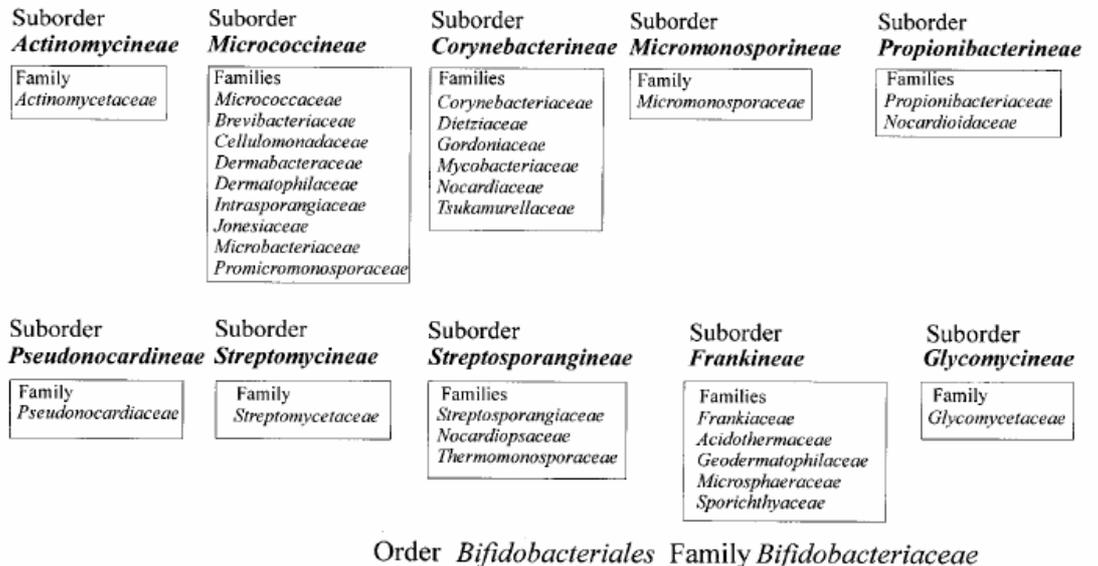


Figure 3 : Système de classification hiérarchique proposé par Stackebrandt de la classe des *Actinobacteria* basé sur l'analyse phylogénétique des séquences de 16S rDNA/rRNA (Stackebrandt *et al.*, 1997).

ordres avec différentes familles (**FIGURE N°3**). Cette nouvelles hierarchie n'a rien changé quant aux genres et espèces des actinomycètes dont la description dans la plupart des cas était basée sur les caractères morphologiques, physiologiques et chimiotaxonomiques.

Même s'il n'existe pas de taxonomie officielle des procaryotes en général et donc des actinomycètes en particulier, il existe une classification utilisée par la majorité des bactériologistes et à laquelle on fait habituellement référence c'est celle du "**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**". Cette classification a pour but de refléter la phylogénie des procaryotes et, pour les taxons d'un rang hiérarchique supérieur au genre, elle est basée principalement, voire exclusivement, sur les séquences des ADNr 16S.

Cette classification est librement disponible sur Internet (voir [Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition](#)).

La classification du "**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**" reconnaît deux domaines ou empires, "*Archaea*" et "*Bacteria*".

3° Les antibiotiques produits par les actinomycètes

3-1 Généralités

Les actinomycètes forment un grand groupe de procaryotes, le plus important dans la nature (**Lacey, 1997**). Continuellement de nouveaux métabolites secondaires à différentes activités biologique sont isolés de souches d'actinomycètes (**Williams *et al.*, 1993 ; Lopes *et al.*, 1999 ; Katsifas *et al.*, 1999**). Tant les activités biologiques que les structures chimiques se révèlent d'une grande diversité comme le montre le **Tableau N°7** (**Sanglier *et al.*, 1993**).

La grande majorité de métabolites isolés sont originaires des espèces de *Streptomyces* (**Anderson et Willington, 2001 ; Sanglier *et al.*, 1993**) comme le montre le **Tableau N° 8**.

Les actinomycètes sont la source de substances **antitumorales** (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine et dannomycine), **insecticides** (mikkomycine), **pesticides** (antimycine A), **herbicides** (phinotricine) et de substances ayant des activités **immunosuppressives** et **immunostimulantes** (la rapamycine et le FK500) (**Tableau N°9**) (**Chun *et al.*, 1997 ; Sanglier et Trujillo, 1997 ; Moore *et al.*, 1999 ; Petrosyan *et al.*, 2003**).

Les **enzymes** sont les plus importants produits des actinomycètes après les **antibiotiques**, (**Lopes *et al.*, 1999**). Certaines sont utilisées dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) et dans celle des détergents (protéases) (**Bressolier *et al.*, 1999 ;**

TABLEAU N°7 : Métabolites secondaires produit par les actinomycètes selon les groupes chimiques (1990-1994) (Sanglier et Trujillo, 1997).

Métabolites	<i>Streptomyces</i> et genres apparentés	<i>Actinoplanaceae</i>	<i>Maduromycetes</i>	<i>Nocardioformes</i>	Autres genres
Sucres	24	1	1	10	6
Lactones macrocycliques	97	30	0	12	15
Quinones	31	0	1	1	0
Peptides	84	1	2	11	8
Système hétérocyclique	165	15	32	3	7
Squelette aliphatique	2	0	0	0	0
Squelette aromatique	123	12	5	6	0
Chaîne aliphatique	24	0	0	0	0
Autres	211	27	34	0	13
Totale	761	86	75	40	49

TABLEAU N°8 : Nombre de classes chimiques produites par les différents genres d'actinomycètes (1990-1994) (Sanglier et Trujillo, 1997).

Genres	Diversité chimique
<i>Streptomyces</i>	63
<i>Streptoverticillium</i>	12
<i>Actinoplanes</i>	4
<i>Dactylosporangium</i>	1
<i>Micromonospora</i>	11
<i>Actinomadura</i>	15
<i>Microbispora</i>	3
<i>Planobispora</i>	1
<i>Streptosporangium</i>	3
<i>Nocardia</i>	4
<i>Amycolatopsis</i>	8
<i>Nocardioides</i>	2
<i>Saccharopolysopora</i>	14
<i>Kibdelosporangium</i>	3
<i>Kitasatosporia</i>	1
<i>Sacharothrix</i>	9
<i>Thermoactinomyces</i>	1
<i>Arthrobacter</i>	1
<i>Brevibactérium</i>	1

Hu et Ochi, 2001). Parmi les protéinases identifiées et isolées du genre *Streptomyces* on peut citer les sérine-protéinases isolées de *Streptomyces pactum*, métallo- et sérine-protéinase de *Streptomyces exfoliatus* et aminopeptidase de *Streptomyces rimosus* (Bockle *et al.*, 1995 ; Lopes *et al.*, 1999).

Les actinomycètes sont surtout importants du fait qu'ils sont à l'origine de nombreux antibiotiques. Parmi les **25000** antibiotiques actuellement décrits, environ 70% sont synthétisés par les microorganismes, dont 60% par les actinomycètes (Leclerc *et al.*, 1986). Il est à noter que parmi les actinomycètes, le genre *Streptomyces* est la source la plus importante d'antibiotiques (Okami et Hotta, 1988 ; Long et Wildman, 1993 ; Sanchez, 1996 ; Hwang *et al.*, 2001). A partir de 1955 le genre *Streptomyces* devient, et va rester le grand fournisseur d'antibiotiques nouveaux (Larpen et Sanglier, 1989 ; Sanglier *et al.*, 1993 ; Wu et Chen, 1995 ; Hwang *et al.*, 2001) bien que d'autres structures nouvelles soient isolées d'autres genres comme *Actinomadura* et *Micromonospora* (Sanglier *et al.*, 1993).

L'histoire des antibiotiques tels que nous les connaissons actuellement a débuté durant la seconde guerre mondiale avec la production industrielle aux Etats-Unis des premiers médicaments à base de pénicilline. Ces traitements ont permis de sauver plusieurs millions de personnes et la production de pénicilline a véritablement fait partie de l'effort de guerre. Les laboratoires de recherche industriels et académiques ont alors engagé un processus à grande échelle pour découvrir de nouveaux principes actifs afin d'enrayer les autres infections bactériennes connues. Au cours des décennies suivantes, les recherches entreprises ont permis de compléter l'arsenal antibactérien mis à la disposition des médecins et du grand public. La **streptomycine** fut isolée à partir de *Streptomyces griseus* en 1943, le **chloramphénicol** à partir de *Streptomyces venezualae* en 1947, la **chlortétracycline** à partir de *Streptomyces aureofaciens* en 1948, l'érythromycine à partir de *Streptomyces erythreus* en 1952, etc. Depuis les années **1950-60**, de multiples dérivés semi-synthétiques d'antibiotiques naturels (par exemple les fluoroquinolones), rendus plus actifs par ajout de divers substituant, et des antibiotiques entièrement synthétiques (par exemple l'azithromycine) sont commercialisés par les entreprises pharmaceutiques. Il s'agit toutefois uniquement de molécules appartenant à des classes d'antibiotiques déjà connues. En effet, au cours des trente dernières années, les connaissances scientifiques n'ont permis la découverte que d'une seule nouvelle famille d'antibiotiques non naturels, celle des oxazolidinones (Slee *et al.*, 1987 ; Swaney *et al.*, 1998). Aujourd'hui, les traitements antibactériens à base d'antibiotiques, appelés «antibiothérapies», sont largement prescrits. En 1997, la commercialisation des

TABLEAU N°9 : Bioactivité des métabolites isolés à partir d'actinomycètes (1990-1994) (Sanglier et Trujillo, 1997).

Métabolites bio-actifs	<i>Streptomyces</i> et genres apparentés	<i>Actinoplanaceae</i>	<i>Maduromycetes</i>	<i>Nocardioformes</i>	Autres genres
Anti-Gram positifs	225	18	41	44	19
Anti-Gram négatifs	83	2	11	21	9
Antifongiques	97	1	30	2	6
Anti-levures	69	1	25	2	6
Anti-parasitaires,	30	-	8	-	4
<i>Herbicides</i>	23	-	2	-	3
Insecticides	28	-	-	10	-
Antiviraux	35	-	8	20	4
Anticancéreux	179	11	10	5	8
Inhibiteurs d'enzymes	126	1	15	3	2
Agents pharmacologiques	160	2	10	7	4
Autres	48	6	4	3	5
Total	1103	42	164	118	70

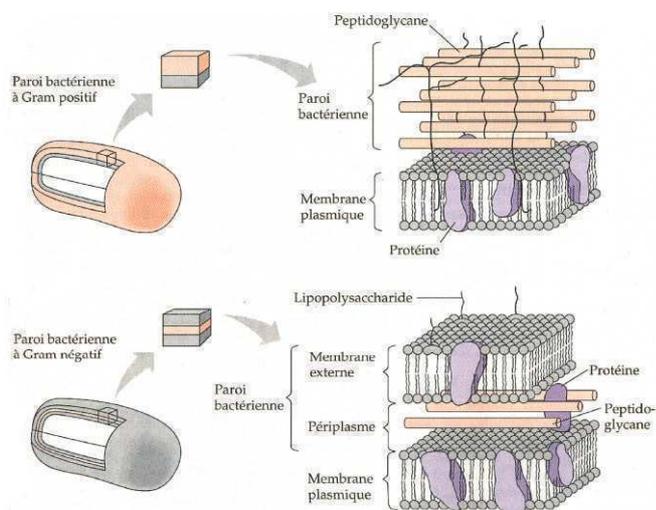


FIGURE N°4 : Schéma en coupe de la paroi des eubactéries. **(a)** Les bactéries dites à Gram-positif possèdent une paroi épaisse (15 à 80 nm) composée à 90% par le peptidoglycane, et à 10% par un polymère anionique appelé acide téichoïque (polymère de glycérol ou de ribitol relié par des groupements phosphates) (**Ward et Curtis, 1982**). **(b)** Chez les bactéries à Gram-négatif, la paroi est plus fine (10 à 15 nm) et de constitution plus complexe : une fine couche de peptidoglycane (1 à 3 nm) est surmontée d'une membrane externe, formée par une couche interne de phospholipides et d'une couche externe de lipopolysaccharides. Cette membrane externe constitue une barrière de protection contre les agents toxiques. Des protéines spécialisées appelées porines y sont enchassées et permettent le passage de molécules de masse moléculaire inférieure à 600 Da vers le périplasme (**Green, 2002**).

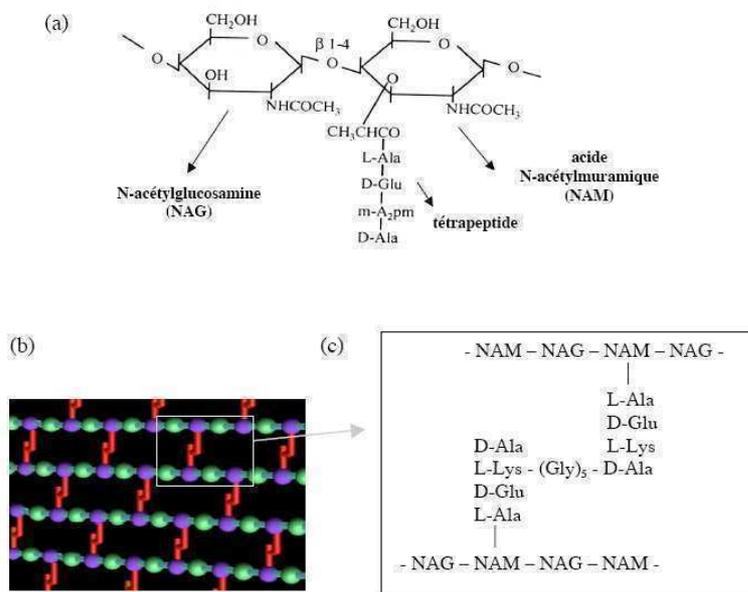


FIGURE N°5 : **(a)** Composition de la sous-unité de base et **(b)** structure générale du peptidoglycane (**Ghuysen, 1997**). Les résidus N-acétylglucosamine (NAG) et acide N-acétylmuramique (NAM) sont liés par une liaison β 1-4. L'acide N-acétylmuramique porte un térapeptide composé d'une alternance d'acides aminés de configuration L et D, dont le troisième acide aminé est un résidu diaminé (acide méso-diaminopimélique). Pour la plupart des bactéries, la fonction amine libre de ce résidu est reliée par une liaison amide à l'extrémité carboxyle d'un térapeptide d'une chaîne de glycane voisine. Pour d'autres bactéries, un pont interpeptidique permet la liaison entre la fonction amine libre du résidu diaminé et la fonction carboxyle de l'autre peptide. **(c)** Chez *Staphylococcus aureus*, le troisième acide aminé est une L-Lysine, et un pont pentaglycine permet la liaison entre les deux térapeptides (**Ghuysen et al., 1984**).

antibiotiques représentait un marché mondial de 16 milliards d'euros (**Carbon et Bax, 1998**). En provoquant une importante diminution du taux de mortalité, la découverte des antibiotiques a profondément bouleversé la médecine moderne.

Les antibiotiques qui sont utilisés à l'heure actuelle peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Pour qu'ils soient toxiques pour les bactéries, mais inoffensifs pour l'hôte à qui on administre le traitement, les antibiotiques ont pour cibles principales les constituants moléculaires proprement bactériens. Actuellement, les molécules antibactériennes disponibles agissent en priorité au niveau de la biosynthèse et le maintien de la paroi cellulaire, des protéines, et de l'ADN bactériens (**Walsh, 2000**). La biosynthèse de la paroi cellulaire peut être inhibée pour empêcher la croissance des bactéries. Plusieurs classes d'antibiotiques bloquent la synthèse protéique en agissant sur les ribosomes bactériens. Les composés qui inhibent la synthèse des acides nucléiques agissent souvent au niveau de l'ARN polymérase ou des topoisomérases bactériennes.

3-2 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

Trois classes d'antibiotiques sont concernées : les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine.

3-2-1 Paroi bactérienne et synthèse du peptidoglycane

Le monde bactérien se distingue entre autres du monde animal et végétal par la présence d'une paroi d'un type particulier. Le peptidoglycane, qui en est le constituant principal, est en effet spécifique du monde bactérien. Il s'agit d'un polymère formé de longues chaînes polyosidiques reliées entre elles par des ponts peptidiques. Cet ensemble, ainsi réticulé, forme un maillage qui entoure la bactérie, lui conférant sa forme et sa rigidité. Il occupe une position différente selon que la bactérie est à coloration de Gram positive ou à coloration de Gram négative (**FIGURE N° 4**), mais, dans tous les cas, le peptidoglycane est étroitement lié aux processus de croissance et de division cellulaire (**Green, 2002**).

Le peptidoglycane est un mucopolysaccharide composé de chaînes linéaires osidiques pontées par de courts peptides (**Van Heijenoort, 2001**) (**FIGURE N°5**). Les chaînes osidiques sont formées par une alternance de résidus N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Chaque disaccharide porte un térapeptide fixé au groupement lactyle de l'unité NAM. La formation de ponts entre les peptides des chaînes glycanes voisines crée une véritable réticulation de la paroi (**FIGURE N°5**). La

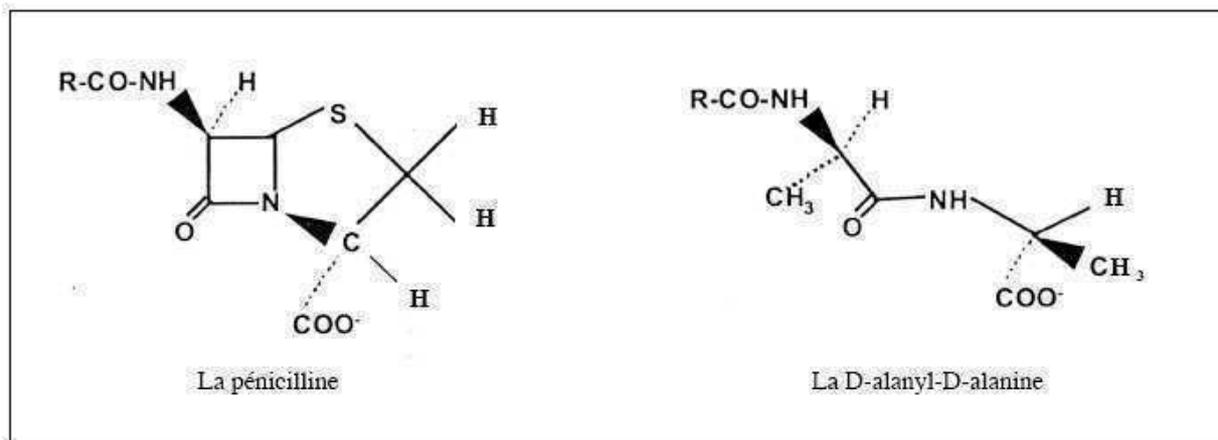


FIGURE N°6 : Similarité de structure entre les antibiotiques à noyau β -lactames (ici la pénicilline) et le substrat naturel des DD-peptidases (D-alanyl-D-alanine).

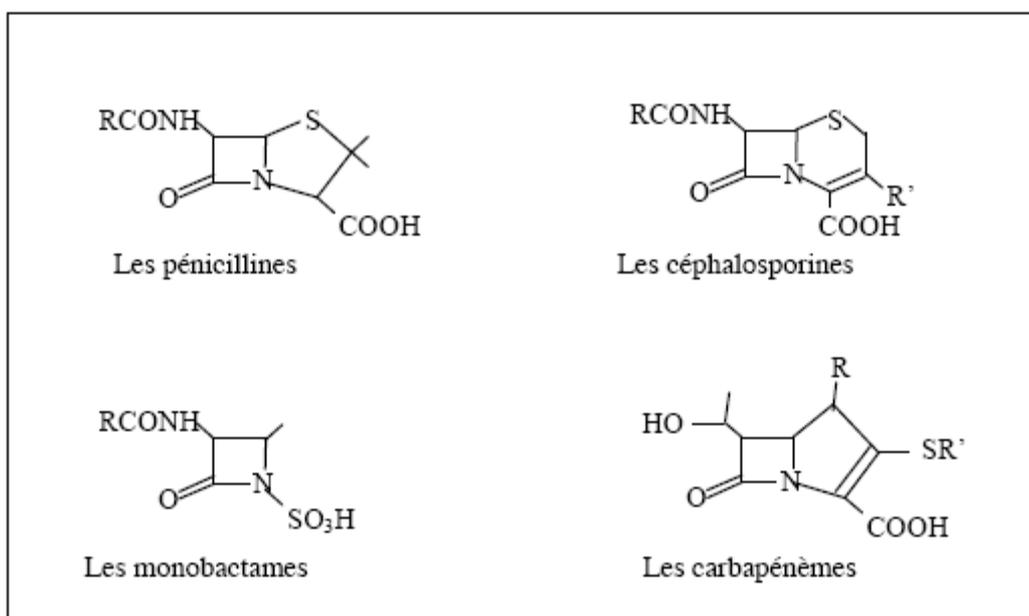


FIGURE N°7: Les différentes classes d'antibiotiques à noyau β -lactame.

composition du pont interpeptidique et le degré de pontage varient selon les espèces bactériennes (**Van Heijenoort, 2001 ; Rohrer et Berger-Bächi, 2003**).

La synthèse du peptidoglycane débute dans le cytoplasme de la bactérie, se poursuit dans la membrane cytoplasmique et se termine dans la paroi déjà formée. Un certain nombre d'enzymes interviennent dans la synthèse du peptidoglycane dont les plus importantes sont les transpeptidases, les transglycosylases et les carboxypeptidases (**Rohrer et Berger-Bächi, 2003 ; Green, 2002 ; Van Heijenoort, 2001 ; Ghusen *et al.*, 1996**).

3-2-2 Structure et mode d'action des antibiotiques de type β -lactame

Les β -lactamines se fixent sur des protéines de la membrane cytoplasmique : les protéines liant les pénicillines (PLP). Ce sont les cibles des β -lactamines. Ces PLP sont en fait les enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane : les transpeptidases, les carboxypeptidases et les transglycosylases. Les β -lactamines présentent une analogie structurale avec un constituant du peptidoglycane en formation, le dipeptide D-ala–D-ala qui est le substrat naturel de ces enzymes (**FIGURE N° 6**) (**Tipper et Strominger, 1965 ; Ghuisen *et al.*, 1984**). Elles agissent en « substrat suicide » et bloquent le fonctionnement de ces enzymes, inhibant ainsi la formation du peptidoglycane.

Les antibiotiques à noyau β -lactame (ou β -lactamines) sont caractérisés par un cycle β -lactame à quatre liaisons dont la tension stérique rend la liaison amide plus réactionnelle qu'une liaison amide linéaire. Les β -lactamines sont divisées en quatre grandes classes selon la nature de l'hétérocycle à 5 ou 6 atomes accolés au noyau β -lactame (**FIGURE N°7**).

Les β -lactamines exercent un effet bactériostatique en empêchant les bactéries de se multiplier. Le blocage de la multiplication est suivi d'une lyse bactérienne. Le peptidoglycane est dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne (**Calamita et Doyle, 2002**). L'efficacité des β -lactamines tient en partie à cette lyse : c'est la bactéricidie. Le mécanisme exact de ce phénomène reste sujet à discussion. Le nombre et la nature des PLP varient selon les espèces bactériennes. L'affinité des diverses PLP n'est pas la même pour toutes les molécules de β -lactamines. L'effet d'une β -lactamine est donc fonction de son affinité pour les différentes PLP de la bactérie considérée. Chez les bactéries à coloration de Gram positive Les molécules de β -lactamines traversent facilement le peptidoglycane, qui ne constitue pas une barrière, pour aller se fixer sur les cibles. Chez les bactéries à coloration de Gram négative, il existe pour ces bactéries un obstacle à l'accès des β -lactamines à leurs cibles : la

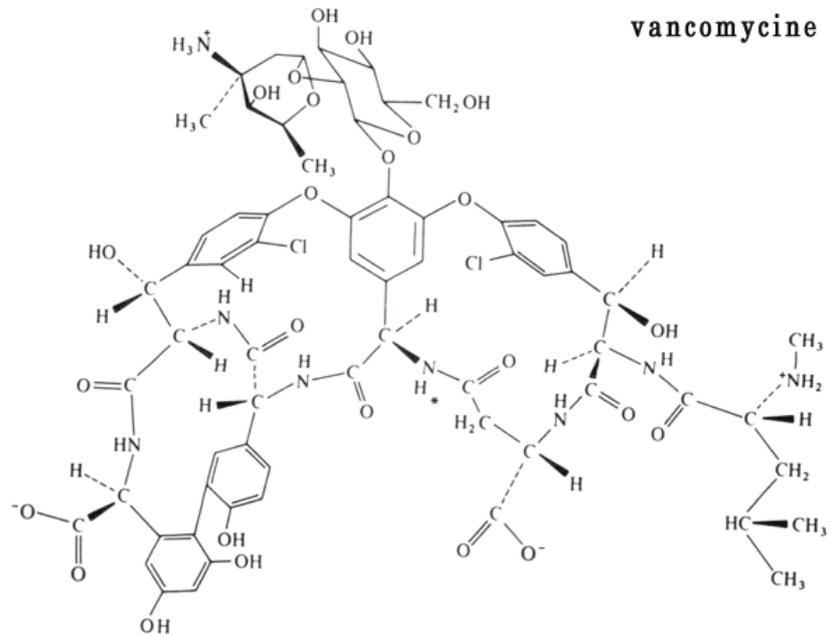


FIGURE N°8 : Structure de la vancomycine

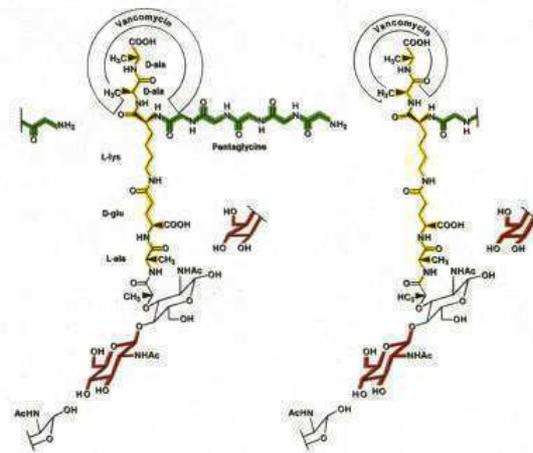


FIGURE N°9 : Mode d'action de la vancomycine (Ramakrishnan Nagarajan, 1991).

membrane externe. Les molécules antibiotiques doivent la traverser, passer ensuite le peptidoglycane et l'espace périplasmique pour arriver au niveau des PLP. La traversée de la membrane externe peut s'effectuer, pour les molécules hydrophobes, par diffusion passive à travers la bicouche lipidique. Les molécules hydrophiles empruntent des canaux, les pores que forment des protéines spécialisées : les porines. C'est la voie principale pour les β -lactamines. Il est clair que le passage des β -lactamines, et donc leur activité, est conditionné par le nombre de ces pores et par leur perméabilité. Ainsi le diamètre des pores de *Escherichia coli* est de l'ordre de 7 à 10 Å, excluant les molécules dont le poids moléculaire dépasse 600 Da.

Le succès des β -lactamines en thérapie humaine réside dans le fait qu'elles exercent leur effet antibiotique sur les germes contenant une paroi riche en peptidoglycane, et n'ont en général aucun effet sur les organites dépourvus de peptidoglycane, comme les cellules animales. Les effets secondaires lors de la prise de β -lactamines sont donc très réduits, malgré une bonne efficacité bactéricide. Malheureusement, l'efficacité des β -lactamines a été largement diminuée par l'apparition de souches bactériennes résistantes à ces antibiotiques.

3-2-3 Structure et mode d'action des glycopeptides

Le premier glycopeptide isolé, la **vancomycine**, l'a été en **1956** à partir d'échantillon de sols prélevés en Inde et en Indonésie, contenant le germe *Streptomyces orientalis* (*Nocardia orientalis*).

Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres (mannose et glucosamine dans la teicoplanine; glucose et vancosamine dans la vancomycine) **FIGURE N°8 (Ramakrishnan Nagarajan, 1991)**.

Les glycopeptides sont au même titre que les β -lactames des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Leur action est toutefois différente : l'analogie structurale avec la partie peptidique du peptidoglycane (pentapeptide) leur permet de se fixer aux niveau des extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques lorsqu'ils émergent de la membrane cytoplasmique, durant leur transport à travers celle-ci en formant des liaisons hydrogène **FIGURE N°9 (Ramakrishnan Nagarajan, 1991)**. Cette fixation du type clé-serrure inhibe la transglycosylase, l'enzyme qui assure le transfert du disaccharide du précurseur du peptidoglycane au polymère glycane en formation (**Anderson et al., 1965 ; Anderson et al., 1967**), cette inhibition est vraisemblablement due à l'encombrement stérique du précurseur

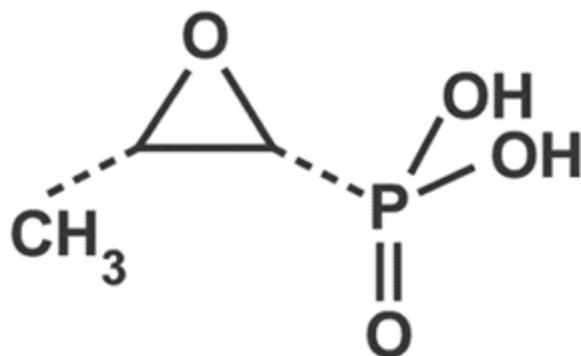


FIGURE N°10 : Structure de la fosfomycine

glycopeptide-peptidoglycane (**Reynolds, 1989**). De plus, même si la synthèse de certaines chaînes glycanes se produisait, la transpeptidase est probablement inhibée puisque la partie acyl-D-Ala-D-Ala du précurseur du peptidoglycane est enveloppée par le glycopeptide (**Reynolds, 1989**).

Il semble que les étapes de transglycosylation et de transpeptidation, nécessaire à la bonne synthèse du peptidoglycane action subséquente de la transpeptidase (qui catalyse l'enlèvement du D-Ala terminal et la réticulation du peptidoglycane) peuvent être inhibées par les glycopeptides. Ce sont de volumineuses molécules qui ne sont actives que sur les bactéries à coloration de Gram positive. En effet, elles ne peuvent traverser les pores de la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative.

3-2-4 Structure et mode d'action de la fosfomycine

La **fosfomycine** a été découverte en **1968** comme métabolite secondaire produit par différentes espèces de bactéries du genre *Streptomyces* (**Hendling et al., 1969**). La fosfomycine appartient à la famille des acides phosphoniques, son intérêt considérable lui revient au fait qu'elle soit une molécule complètement nouvelle ayant une activité bactéricide avec les propriétés appropriées, telles qu'un large spectre, couvrant beaucoup de bactéries pathogènes et opportunistes à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* et certaines espèces du genre *Streptococcus*) et des bactéries à coloration de Gram négative (*Pseudomonas aeruginosa* et *Neisseria* spp., et des membres de la famille des *Enterobacteriaceae*) (**Bartmann et Tarbuc, 1980 ; Forsgren et walder, 1983 ; Mata et al., 1977 ; Zimmerman et al., 1970**). Sa structure chimique (**FIGURE N°10**) (**Christensen et al., 1969**) présente de nouveaux dispositifs (comportant, un groupe époxyde stable et une liaison directe carbone-phosphore) tous les deux nécessaires pour les activités thérapeutiques (**Christensen et al., 1969 ; Kahan et al., 1974**). Ces dispositifs expliquent l'absence de la résistance croisée avec d'autres antibiotiques utilisés dans la thérapie (**Stapley et al., 1970**).

La fosfomycine agit sur des étapes précoces de la synthèse du peptidoglycane (**Kahan et al., 1974**). En effet, la fosfomycine se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe l'enzyme **pyruvyl-transférase** (ou pyruvate-UDP-N-acétylglucosamine-transférase), ce qui a pour conséquence de bloquer la formation d'acide N-acétylmuraminique (réaction ci-dessous), l'un des constituants essentiels du peptidoglycane de la paroi bactérienne (**Cassidy et Kahan, 1973 ; Kahan et al., 1974 ; Smeyers et al., 1987 ; Smeyers et al., 1983 ; Von Carstenn-Lichterfelde et al., 1983**).

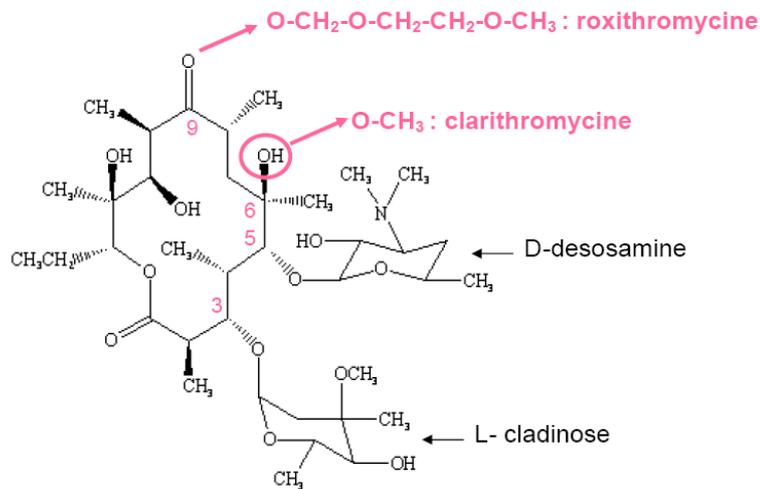


FIGURE N°11. Structure chimique de l'érythromycine A et exemples de modifications des substituants pour la synthèse de dérivés. D'après **Adachi et Morimoto (2002)**.

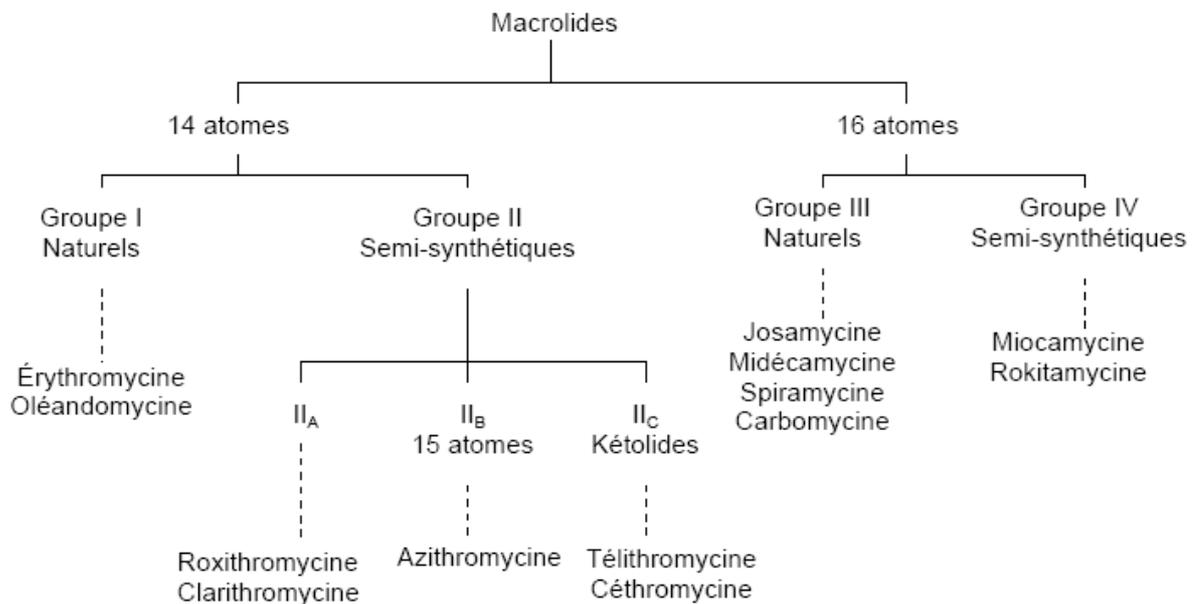


FIGURE N°12. Classification des macrolides. D'après **Bryskier et al. (1993)** et **Labro (2002)**.

UDP-N-acétylglucosamine + Phosphoénolpyruvate → Phosphate + Acide UDP-N-acétyl-muramique

Elle doit donc pénétrer, quel que soit le type de bactéries, dans le cytoplasme bactérien. Son passage à travers la membrane cytoplasmique se fait par transport actif. Une fois dans le cytoplasme, la fosfomycine inhibe les premières étapes de la formation du peptidoglycane en se fixant sur une enzyme, la pyruvyltransférase, impliquée dans la formation d'un précurseur du peptidoglycane. Il y a arrêt de la synthèse de la paroi bactérienne et mort de la bactérie.

3-3 Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Les antibiotiques de cette catégorie les plus importants en médecine sont les **aminosides**, les **macrolides**, les **tétracyclines** et la **rifampicine**. La synthèse des protéines s'effectue dans le cytoplasme au niveau du ribosome bactérien. Il faut donc, pour toutes ces molécules, traverser le peptidoglycane et les diverses membranes pour arriver dans le cytoplasme et atteindre leur cible : le ribosome.

3-3-1 Structure des Macrolides et apparentés (MLS)

Les **macrolides** représentent l'un des principaux groupes d'antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine et constituent avec les **lincosamides** et **streptogramines** une famille d'antibiotiques, les MLS, de structures différentes mais présentant des mécanismes d'action et un spectre antibactérien similaire.

Le nom « **macrolide** » vient de **macro** (grand) et **olide** (**lactone** ou **ester intracyclique**). Par définition, ils possèdent un large noyau lactonique central de 12 à 16 chaînons sur lequel se greffent des sucres neutres ou aminés. Le cycle lactone est substitué par des groupements alkyles ou hydroxyles (**Bryskier et al., 1993**).

Le chef de file de ce groupe est l'**érythromycine**, qui a été isolée en **1952** de culture de *Streptomyces erythrea*. Ce microorganisme produit au moins six types de molécules d'érythromycine différentes, de A à F, mais seule l'érythromycine A possède une vraie activité antimicrobienne. Elle est constituée d'un cycle lactonique à 14 atomes sur lequel sont fixés deux sucres par liaison glycosidique : un sucre neutre (L-cladinose) en position 3 et un sucre aminé (D-desosamine) en position 5 (**FIGURE N°11**).

La plupart des macrolides sont produits par des espèces de *Streptomyces* et d'autres bactéries actinomycètes du sol, mais il existe également des macrolides semi-synthétiques obtenus par modification chimique des produits naturels. La classification présentée dans la **FIGURE N°12** se base sur le nombre de chaînons de la structure

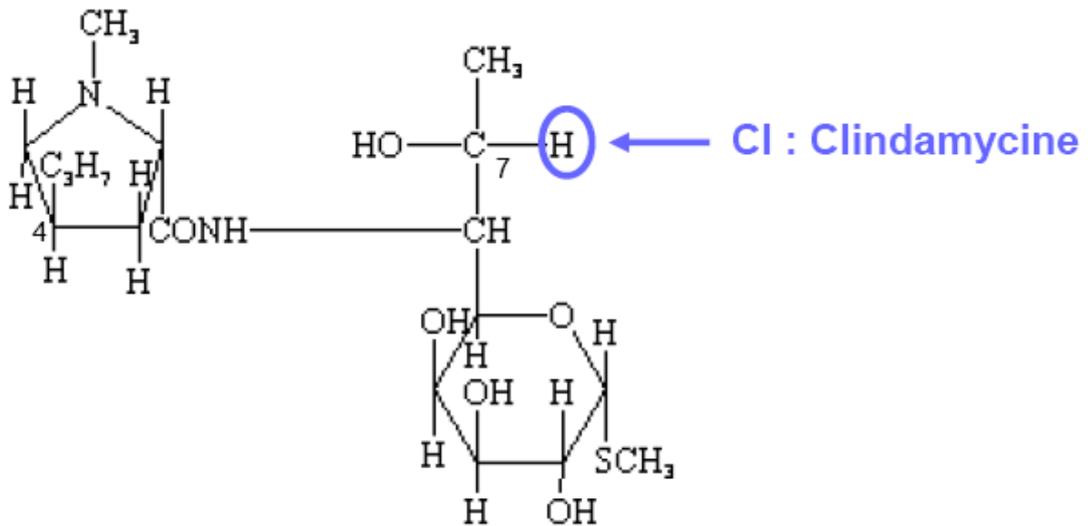


FIGURE N°13 : Structure chimique de la lincomycine et de la clindamycine.

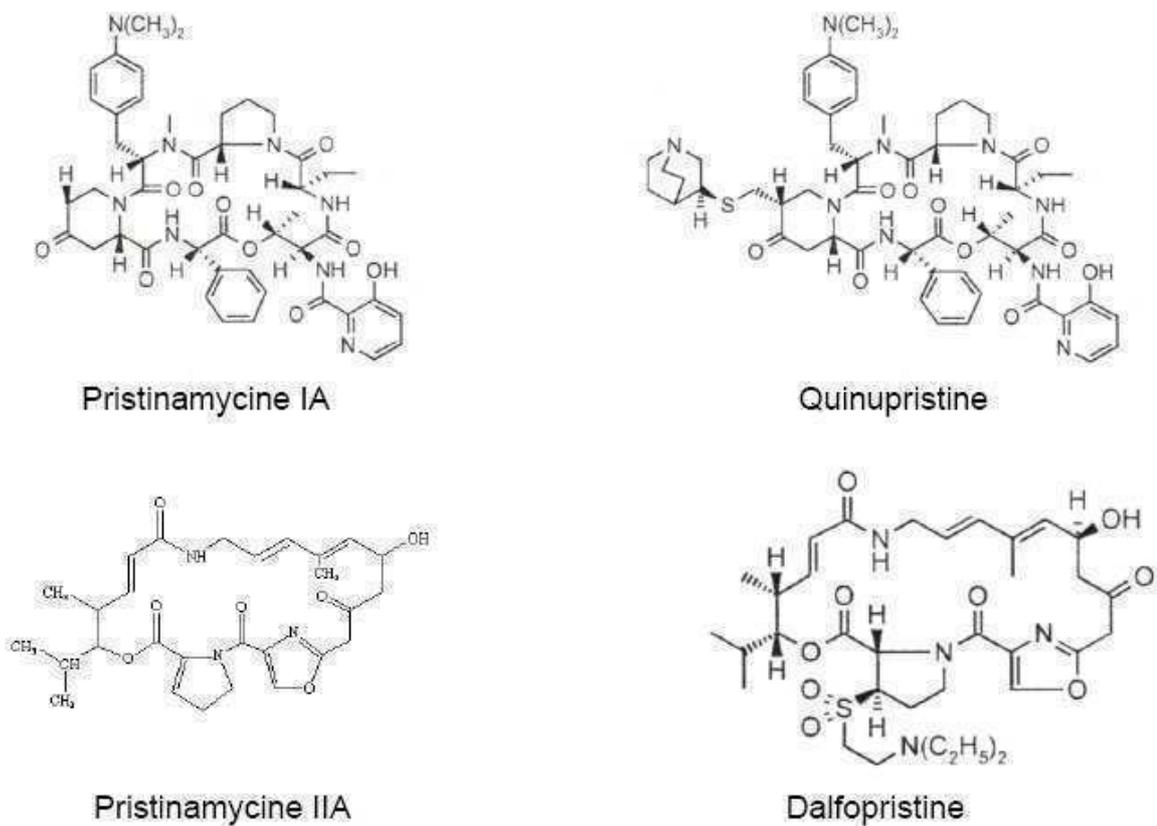


FIGURE N°14 : Structure chimique des streptogramines B (pristinamycine IA et quinupristine) et des streptogramines A (pristinamycine IIA et dalfopristine). D'après Canu et Leclercq (2001).

lactonique et l'origine naturelle ou semisynthétique des molécules (Bryskier *et al.*, 1993 ; Labro, 2002).

Les **lincosamides** sont constitués d'un acide aminé, la L-proline, substitué par une chaîne alkyle en position 4, et d'un sucre comportant un atome de soufre (lincosamine), reliés entre eux par une liaison amide (FIGURE N°13). Le principal représentant naturel de ce groupe est la **lincomycine**, produite par *Streptomyces lincolnensis*. Il existe également un dérivé semisynthétique chloré de cette molécule, la clindamycine (Bryskier, 1999a).

Les **streptogramines A** sont des macrolactones cycliques polyinsaturées alors que les streptogramines B sont des hexadepsipeptides cycliques (Bryskier, 1999b). La **pristinamycine** est une streptogramine naturelle produite par *Streptomyces pristinaespiralis* (Preud'homme *et al.*, 1965). Elle est composée de 30% de pristinamycine I (streptogramine B, mélange de pristinamycine IA, IB et IC) et de 70% de pristinamycine II (streptogramine A, mélange de pristinamycine IIA et IIB) (FIGURE N°14).

Les macrolides se fixent sur la cible, l'ARN ribosomal 23S de la sous-unité 50S du ribosome. Les sites de fixation diffèrent légèrement selon les molécules, mais le mécanisme d'action est identique. La fixation du macrolide au ribosome entraîne l'inhibition de l'élongation du peptide en formation.

Les lincosamides agissent de même et ces deux classes sont en général considérées comme bactériostatiques. Cependant, à fortes doses, notamment en intracellulaire où ces antibiotiques se concentrent, ces molécules sont bactéricides.

Les synergistines (ou **streptogramines**) sont formées de deux composés, A et B, qui agissent en synergie. La fixation du composé A favorise la fixation du composé B, ce qui expliquerait en partie la synergie et l'effet non plus bactériostatique mais bactéricide.

3-3-2 Structure et mode d'action des phénicolés

Les phénicolés sont des antibiotiques potentiellement utiles en raison de leur large spectre et de leur bonne pénétration dans le système nerveux central, mais dont l'usage est actuellement limité par leur toxicité médullaire. Les phénicolés sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs aussi d'un phényle substitué. Le groupement dichloroacétamide est certainement important pour l'activité antibiotique.

Deux molécules seulement sont utilisées en clinique : le chloramphénicol (FIGURE N°15), réservé à l'usage topique en raison de sa toxicité, et le thiamphénicol (FIGURE N°16).

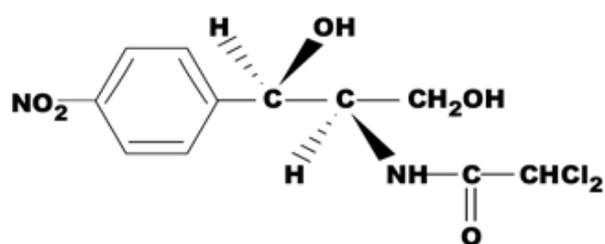


FIGURE N°15 : Structure du Chloramphénicol

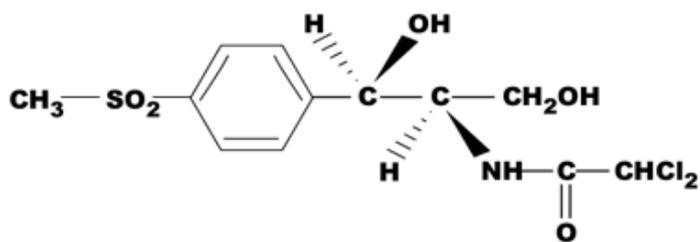


FIGURE N°16 : Structure du Thiamphénicol

TABLEAU N°10 : Aminoglycosides contenant le cycle 2-DOS. Le cycle 2-DOS est coloré en bleu. La partie néamine est encadrée par des pointillés.

Substitution glycosidique	Exemple	Origine	Nature chimique
4-	Apramycine	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	
5-	Hygromycine B	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	
4,5-	Néomycine Paromomycine	<i>Streptomyces fradiae</i> <i>Streptomyces rimosus</i>	<p> Néamine ($R=NH_3^+$) Ribostamycine (néamine+cycle III) Néomycine ($R=NH_3^+$) Paromomycine ($R=OH$) </p>
4,6-	Kanamycine Tobramycine	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> <i>Streptomyces tenebrarius</i>	<p> Kanamycine A ($R_1=OH; R_2=OH$) Kanamycine B ($R_1=NH_3^+; R_2=OH$) Tobramycine ($R_1=NH_3^+; R_2=H$) </p>
	Gentamicine C1a Généticine	<i>Micromonospora purpurea</i> <i>Micromonospora rhodorangea</i>	<p> Gentamicine C1a ($R_1=H; R_2=H; R_3=H; R_4=NH_3^+$) Généticine ($R_1=OH; R_2=OH; R_3=CH_3; R_4=OH$) </p>

Comme les macrolides et les lincosamides, les phénicolés se fixent à la sous-unité 50 S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation, et donc la réaction de transpeptidation. L'action du chloramphénicol n'est pas tout à fait spécifique, dans la mesure où elle peut également s'exercer dans les cellules de mammifères, et plus particulièrement, les cellules souches hématopoïétiques.

3-3-3 Structure et mode d'action des aminoglycosides

En 1942 débutait la commercialisation de la pénicilline, premier traitement antibiotique disponible, mais qui était inactif contre *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent responsable de la tuberculose. Par criblage systématique de cultures bactériennes de *Mycobacterium tuberculosis*, **Selman Waksman** a isolé en 1943 le premier agent anti-tuberculose, la **streptomycine**, à partir de *Streptomyces griseus*. Sa commercialisation a débuté en 1944, suivie par celle de la **néomycine**, de la **kanamycine** et des autres **aminoglycosides** naturels jusqu'en 1967. Au delà de cette date, les composés mis sur le marché comme l'amikacine sont semi-synthétiques (**Busscher et al., 2005**)

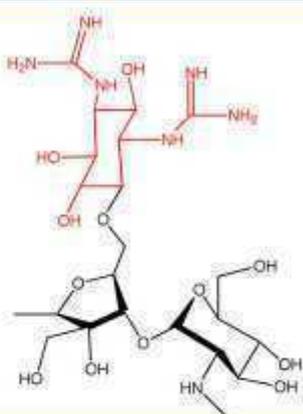
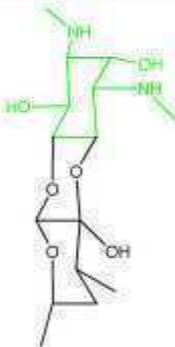
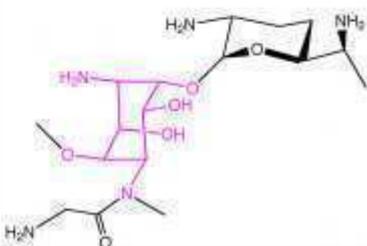
La majorité des aminoglycosides naturels ont été obtenus à partir d'actinomycètes de type *Streptomyces* (ils prennent alors le suffixe « **-mycine** ») ou de type *Micromonospora* (le suffixe associé est alors « **-micin** »).

Les aminoglycosides sont des bases faibles, cationiques à pH physiologique (**Botto et Coxon, 1983 ; Kaul et Pilch, 2002**) et solubles dans l'eau.

La principale caractéristique structurale des aminoglycosides réside dans le cycle 1,3-diaminocyclohexanetriol appelé streptamine ou, lorsque dans la majorité des cas ce cycle est privé de la fonction hydroxyle en position 2, le cycle 2-déoxystreptamine (2-DOS) (**Kondo et Hotta, 1999 ; Ritter et Wong, 2001 ; Herman, 2005**) **Tableau N° 10**. Cette différence permet de classer les aminoglycosides en deux principales sous-familles (avec le cycle 2-DOS ou avec le cycle streptamine). Le deuxième niveau de classification repose sur le mode de substitution du cycle 2-DOS (**Price et Godfrey, 1974 ; Kondo et Hotta, 1999**) selon quatre combinaisons (**Tableau N° 11**) :

- Substitution en position 4 : exemple de l'apramycine (**Han et al., 2005**)
- Substitution en position 5 : exemple de l'hygromycine B (**Brodersen et al., 2000**)
- Substitution en position 4 et 5 : composés 4,5-2-Dos tels que néomycine et paromomycine.

TABLEAU N°11 : Aminoglycosides ne contenant pas le cycle 2-DOS. Le code utilisé pour colorer les diaminocyclitols est celui de la Figure 1.2.

Diaminocyclitol	Substitution glycosidique	Exemple	Origine	Nature chimique
Streptidine	4-	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	
Actinamine	4,5-	Spectinomycine	<i>Streptomyces spectabilis</i>	
Fortamine	6-	Fortimicine A	<i>Micromonospora olivoasterospora</i>	

- Substitution en position 4 et 6 : composés 4,6-2-DOS tels que kanamycine et tobramycine.

Chaque aminoglycoside se distingue des autres membres de son groupe ou sous-groupe par son nombre de cycles additionnels au 2-DOS (de un dans le cas de la néamine à quatre dans le cas de la lividomycine A) et par la nature des groupements fonctionnels (hydroxyles et ammoniums pour les aminoglycosides naturels) répartis sur ces cycles.

Les aminoglycosides ont pour cible cellulaire principale la sous-unité 30S du ribosome bactérien (Cox *et al.*, 1964 ; Davies, 1964 ; Gale *et al.*, 1981 ; Wright *et al.*, 1998). Différents sites de fixation ont été identifiés par cartographie aux sondes chimiques, selon le sous-groupe auquel appartient l'aminoglycoside (Moazed et Noller 1987 ; Woodcock *et al.*, 1991). Ces sites de fixation sont toujours hautement conservés dans la phylogénie des bactéries (Moazed et Noller 1987).

Les aminoglycosides sont responsables de plusieurs dysfonctionnements irréversibles liés à leur fixation au site A, qui s'enchaînent pour conduire à la mort de la bactérie (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999 ; Wright *et al.*, 1998). Un petit nombre d'aminoglycosides (sous forme cationique au pH physiologique) traverse passivement la paroi des bactéries et se lie par interactions électrostatiques aux lipides de la membrane plasmique des bactéries. Ces aminoglycosides traversent ensuite la membrane plasmique par un mécanisme dépendant de l'énergie fournie par le potentiel transmembranaire, et qui impliquerait une protéine transporteur (Wright *et al.*, 1998).

Au sein de la bactérie, la spécificité des aminoglycosides pour le site A représente la clé de leur action antibiotique. Des études cinétiques (Pape *et al.*, 2000 ; Rodnina et Wintermeyer, 2001) et cristallographiques (Carter *et al.*, 2000 ; Ogle *et al.*, 2001) ont montré que les aminoglycosides se liant au site A stabilisent une conformation locale particulière de la sous-unité 30S. Cette stabilisation fausse le mécanisme de lecture de l'ARNm à traduire (mécanisme de décodage), favorisant ainsi l'incorporation d'acides aminés erronés dans les protéines en cours de synthèse (Davies et Davis, 1968 ; Davies *et al.*, 1965). Par conséquent, la fixation d'un aminoglycoside au site A provoque une accumulation de protéines incorrectement traduites dans la bactérie (Davis, 1987).

3-3-4 Structure et mode d'action des Tétracyclines

Vers la fin des années 1940, les laboratoires LEDERLE isolent un nouvel organisme du sol dont le mycélium aérien devenait jaune doré après quelques jours d'incubation sur gélose (Duggar, 1948) : ce trait lui valut d'être baptisé *Streptomyces aureofaciens*. Cet organisme produisait l'**aureomycine**, une substance qui inhibe la

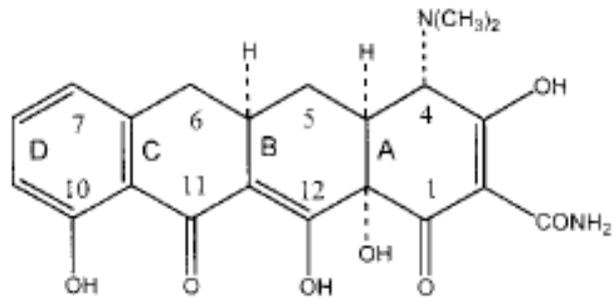


FIGURE N°17 : Squelette des tetracyclines

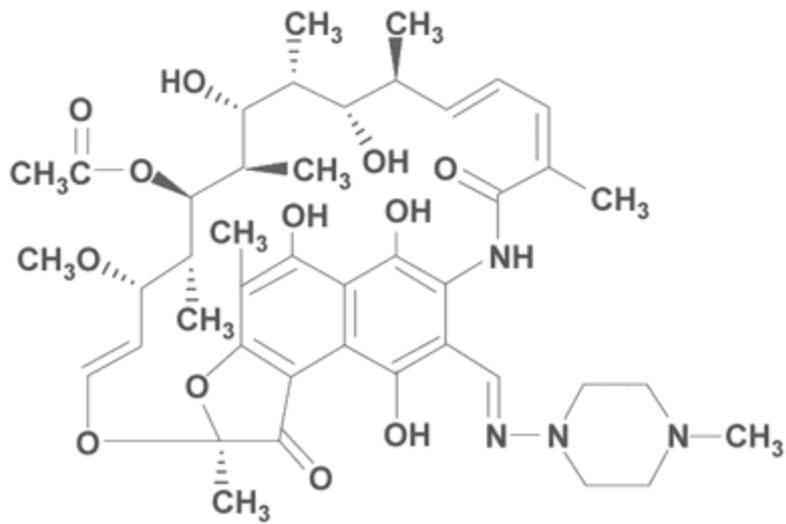


FIGURE N° 18 : Structure de la rifampicine

croissance d'une grande variété d'agents pathogènes. Peu après, une autre espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques fut identifiée par les laboratoires **PFIZER**. Cet organisme nommé *Streptomyces rimosus* en raison de son apparence fissurée sur gélose, produisait la **terramycine** (Finlay *et al.*, 1950), une substance au spectre antibiotique identique à celui de l'auréomycine. Durant les années **1950**, on découvrit que ces deux antibiotiques possèdent un squelette identique, que l'on nomma **tétracycline** (FIGURE N°17). Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'acide aminé-ARNt à la sous unité 30 S du ribosome bactérien. Ce sont des composés bactériostatiques à très large spectre. Néanmoins, leur usage est aujourd'hui limité par l'émergence de résistances.

3-4 Antibiotiques agissant au niveau de l'ARN polymérase (les Rifamycines)

Les ansamycines constituent une famille de composés chimiques dont les représentants peuvent être classés en deux groupes :

- les ansamycines de type naphthalène
- les ansamycines de type benzénique

Les ansamycines de type naphthalène regroupent des composés montrant une activité antibactérienne ou antivirale alors que les ansamycines de type benzénique comportent des molécules à activité antitumorale.

Les **rifamycines** sont des composés appartenant aux **ansamycines** de type naphthalène et ont été isolées à partir de **1957** de la bactérie *Nocardia mediterranei*.

Parmi les composés isolés, la rifamycine-B s'avéra active envers les germes à coloration de Gram positive ainsi que *Mycobacterium tuberculosis* ainsi que quelques germes à coloration de Gram négative.

La rifampicine (FIGURE N°18) (ou N-amino-N'-méthylpipérazine-hydrazone), qui est un composé semi-synthétique issu de la rifamycine-B, montra l'activité la plus élevée, ainsi que la plus faible toxicité. Il est aujourd'hui l'un des médicaments de choix des infections à mycobactéries.

La rifampicine inhibe l'ARN polymérase bactérienne, enzyme responsable de la transcription. Des risques non négligeables de toxicité hépatique sont toutefois associés à son usage. De nouveaux dérivés (rifabutine) trouvent des indications particulières (patients immunodéprimés). Citons encore la rifapentine et la rifamycine S.

Partie expérimentale

**Mise au point d'un protocole d'isolement, étude de la
diversité des actinomycètes dans les écosystèmes
explorés et mise en évidence de l'activité antibiotique**

1- Prélèvement des échantillons

1-1 Sol

Les échantillons de sol ont été prélevés selon la technique de **Pochon et Tardieux (1962)** à partir du sol de Djebel Ouahche de Constantine et d'un sol semi-aride environnant la Sebkhha de Ain M'lila. À l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, on prélève alors avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 centimètres de profondeur) 100 à 150 grammes de terre qui sont déposés sur une feuille d'aluminium stérile. Les gros débris sont écartés (pierres, racines, etc.) et environ 50 grammes sont placés dans un flacon stérile et transportés le plus rapidement possible au laboratoire.

1-2 Eau

Les échantillons d'eaux, ont été prélevés au niveau des tables (bassins) de l'entreprise de sel (ENA Sel Algérie) situé à Ain M'lila, des eaux de lacs situés à la montagne nommée Djebel Ouahche de Constantine et des eaux des deux sources thermales (Gelma et Beni haroune), selon la technique de **Rodier (1984)**, à l'aide d'un plongeur lesté auquel est fixé un flacon en polyéthylène stérile. L'eau recueillie est introduite dans des flacons stériles en verre de 250 mL et transportée dans une glacière au laboratoire. Les analyses sont effectuées au plus tard dans les 24 heures qui suivent les prélèvements.

1-3 Ecorces d'arbres

Les prélèvements des écorces d'arbres ont été effectués à partir de Chênes (*Quercus*) et de Cèdres (*Cedrus*) de la montagne Djebel Ouahche de Constantine, en découpant des morceaux d'écorces à l'aide d'une lame stérile. Les écorces prélevées sont déposées sur une feuille d'aluminium stérile, puis récupérées dans des flacons stériles et transportés au laboratoire (**Kitouni et al., 2005**).

2- Traitement des échantillons

Un gramme de chaque sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 gramme de CaCO_3 et incubé à 28°C pendant 7 jours dans une atmosphère saturée d'humidité (**Cavalla et Eberlin, 1994**). En ce qui concerne l'eau, chaque échantillon est agité en présence de phénol à 7 mg/mL pendant 10 minutes et est filtré à travers une membrane millipore (0,45 μm). Les spores d'actinomycètes sont récupérés en agitant la membrane avec

des billes de verres stériles de 4 mm de diamètre dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L) (Cavalla et Eberlin, 1994). Pour les écorces d'arbres, 10 grammes de chaque échantillon sont broyés et suspendus dans de l'eau physiologique, puis agités vigoureusement au Vortex pendant 10 minutes.

3- Isolement, purification et conservation des actinomycètes

Cent microlitres des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} en eau physiologique (NaCl 9 g/L) des échantillons de sols, d'eaux, et d'écorces d'arbres sont étalés à la surface de trois milieux de culture : la gélose à l'extrait de levure et l'extrait de malt (GLM), le milieu de Bennett et le milieu Glucose-Asparagine (annexe). Ces milieux sont additionnés de 75 μ g/mL d'amphotéricine B pour inhiber le développement des champignons filamenteux et 10 μ g/ml de polymixine pour inhiber les bactéries à coloration de Gram négative. Les boîtes de Petri sont alors incubées à 28°C. Les boîtes sont observées après deux, trois et quatre semaines d'incubation.

A l'aide d'un microscope photonique, les colonies actinomycétales sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique. Elles sont purifiées sur le milieu GLM exempt d'antifongique et d'antibactérien, par la suite, conservées d'une part à - 4°C en gélose inclinée, et d'autre part à - 20°C en suspension en présence de glycérol à 20 % (v/v).

4- Identification moléculaire des souches d'actinomycètes isolées

4-1 Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait selon la technique de Provost *et al.*, (1997). Dans un microtube contenant 500 μ L d'eau distillée qualitébiologie moléculaire stérile est introduite une colonie à laquelle sont ajoutés 150 μ L de suspension d'extraction (Instagène, Bio-Rad). Le mélange est agité en continu au vortex pendant 2 minutes, puis chauffé à 100°C dans un bain marie à sec pendant 30 minutes, puis centrifugé à 10 000 g pendant 8 minutes. Les surnageants contenant les ADN sont alors récupérés dans des microtubes stériles et conservés à -20°C.

4-2 PCR universelle

Chaque souche est identifiées au niveau du genre ou de l'espèce par séquençage d'un fragment du gène ADNr 16S après amplification génique (PCR) à l'aide du couple d'amorces **91E** (3' TCAAAG*GAATTGACGGGGGC 5') et **16S₂** (5' GCCCGGGAACGTATTAC 3') (Relman *et al.*, 1990).

Dix microlitres de la dilution au 1/50^e de l'ADN extrait et 15 µ L (0,66 pmol/µ L) du mélange du couple d'amorce sont introduits dans un tube Ready-To-Go™ PCR (Amersham Biosciences) contenant la *Taq* polymérase, des dNTP, du Tris HCl pH 9, du KCl et MgCl₂. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Minicycler™ Mj. Research), après une dénaturation initiale à 94°C pendant 10 minutes suivie de 45 cycles de PCR à 94, 55 et 72°C pendant 30 secondes chacun suivie enfin par une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

4-3 Electrophorèse

Après amplification, les échantillons sont analysés par électrophorèse pendant 2 heures à 90 volts dans un gel d'agarose à 3 % (Ultra pure, Bio-Rad Laboratories) en tampon TAE 1X additionné de 0,5 µ g/mL de bromure d'éthidium (BET) en présence d'un témoin de poids moléculaire 100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL). Après migration le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées.

4-4 Purification des bandes d'ADN à partir de gel d'agarose

Dans le cas de l'apparition de bandes parasites avec les bandes recherchées après électrophorèse, une purification est réalisée suivant les recommandations du fournisseur du Kit EZNA (Biofidal). La bande d'ADN à purifier est découpée sous UV et pesée. Elle est ensuite introduite dans un microtube stérile, quatre volumes de tampon de solubilisation-fixation « Binding Buffer » par volume de gel sont alors ajoutés (on assume une densité de 1 gramme de gel/1 ml, le volume de gel est alors calculé comme suit : un morceau de gel de 0,2 g aura un volume de 0,2 ml). La mixture est incubée 10 min à 65°C, jusqu'à ce que tout le gel ait fondu. 700 µ l de la mixture sont alors déposés dans une colonne HiBind ® DNA préassemblée dans un tube de collection de 2 ml et centrifugés 1 min à 10000 g à température ambiante. Si le volume total est supérieur à 700 µ l, l'opération précédente est refaite pour le reste du mélange. Un lavage de la colonne avec 500 µ l du tampon Binding Buffer préchauffé à 55°C permet d'éliminer les traces d'agarose. Un deuxième lavage de la colonne est effectué par ajout de 650 µ l du tampon de lavage « DNA WashBuffer » et centrifugation 1 min à 10000 g à température ambiante. L'éluat est jeté et la colonne est replacée dans son tube de collection, une centrifugation colonne vide et bouchon ouvert 3 min à 10000 g est nécessaire pour le séchage de la membrane de silice. En fin la colonne est placée dans un microtube stérile de 1,5 ml, 30-50 µ l (selon la concentration désirée) de tampon

d'élution sont ajoutés directement au centre de la colonne suivie d'une centrifugation d'une minute à 10000 g pour l'élution de l'ADN. Une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée pour vérifier la pureté de l'ADN prélevé.

4-5 Séquençage

Le séquençage dans un seul sens a été effectué en utilisant les amorces 91E et 16S2. Il a été réalisé selon la méthode de Sanger adaptée par le kit de séquençage DYE terminator (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Enfin, c'est le séquenceur d'ADN ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, USA) qui a permis l'analyse automatique des réactions de séquences.

4-6 Analyse des séquences

Les électrophorégrammes bruts ont été analysés par le logiciel **chromas 2.23** (Technelysium Pty Ltd, Tewantin Australie). La séquence obtenue est comparée à d'autres séquences à l'aide de Blast (**Altschul et al., 1997**) dans le site web de Genbank (www.ncbi.nih.gov/blast/blast.cgi) afin de déterminer leur affiliation phylogénétique.

Après avoir aligné les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme Mega version 3.1 (**Kumar et al., 2004**) selon la méthode du "Neighbor joining" (**Saitou et Nei, 1987**). La matrice des distances est calculée selon le modèle Kimura à 2 paramètres (**Kimura, 1980**).

5- Recherche de l'activité antimicrobienne

5-1 Recherche de l'activité antibactérienne

5-1-1 Inocula des bactéries-tests

L'activité antibactérienne des souches actinomycétales isolées est recherchée contre des bactéries-tests qui sont obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) et de l'Hôpital Juntendo, Tokyo Japon. Elles sont constituées de bactéries à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* Mu 50 (résistante à la vancomycine) et *Streptococcus faecalis* ATCC 19433) et contre des bactéries à coloration de Gram négative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 13315 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145).

A partir d'une culture de 18 h sur le milieu Trypticase soy agar (TSA), une suspension de chaque bactéries-tests en eau physiologique (0,9 % NaCl) est préparée. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau

physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0,5 McFarland (une densité optique égale à 0,2 à 650 nm) de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC/ml après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (**Cavalla et Eberlin, 1994**).

5-1-2 Technique des cylindres d'agar

Les souches d'actinomycètes isolées sont ensemencées en stries serrées sur les milieux de Bennett et GLM et incubées à 28°C pendant 7 jours (**Lee et Hwang, 2002**). Des cylindres d'agar de 3 mm de diamètre sont ensuite prélevés à l'emporte pièce et déposés à la surface du milieu de Mueller-Hinton (Merck) préalablement ensemencé par les bactéries-tests. Les boîtes sont alors placées à 4°C pendant 4 heures, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres sont alors mesurés.

5-1-3 Technique des puits

A l'aide d'un emporte-pièce, des puits de 3 mm de diamètre chacun sont creusés dans le milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par écouvillon selon la technique de la NCCLS avec les microorganismes tests. Une quantité de 20 µ l des surnageants des cultures liquides des Actinomycètes est déposée dans chaque puit. Les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres d'inhibitions sont mesurés et notés.

5-2 Recherche de l'activité antifongique

L'activité antifongique des actinomycètes isolées est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar contre les champignons filamenteux obtenus de l'ATCC et de la collection de l'Unité de Mycologie de l'Institut Pasteur (UMIP) *Fusarium oxysporum* UMIP 625.72, *Aspergillus fumigatus* UMIP 1082.74 et *Aspergillus niger* ATCC 16404) et contre les levures *Candida albicans* UMIP 884.65, *Candida albicans* UMIP 48.72 et *Candida tropicalis* R2 UMIP 1275.81 (résistante à l'amphotéricine B et la nystatine) en présence de *Streptomyces noursei* (NRRL B-1714) et *Streptomyces nodosus* (NRRL B-2371) productrices de nystatine et d'amphotéricine A et B respectivement obtenues auprès de la Northern Regional Research Laboratory (NRRL). L'activité est testée sur le milieu casitone : [Bacto casitone 9 g/L (Difco Laboratories, Sparks, U.S.A.), extrait de levure 5 g/L (Merck), citrate de sodium 10 g/L (Prolabo), glucose 20 g/L (Merck), Na₂HPO₄ 3,34 g/L (Merck), KH₂PO₄ 0,54 g/L (Merck) et agar 18 g/L (Merck)] sauf pour *Candida tropicalis* R2, pour laquelle l'activité est réalisée

sur le milieu YMA : [yeast nitrogen base 6,5 g/L (Difco), asparagine 1,5 g/L (Prolabo), glucose 10 g/L (Merck) et agar 20 g/L (Merck)] (**Lemriss *et al.*, 2003**). La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 heures d'incubation à 28°C pour les levures et après 48 heures pour les champignons filamenteux.

Identification morphologique, physiologique,
biochimique et moléculaire des souches
représentatives

1- Etude phénotypique

Les souches actinomycétales représentatives isolées de l'eau de sebkha et du sol de sebkha sont soumises à une étude des différents caractères morphologiques, culturels, physiologiques et biochimiques dans le but de leur identification.

1-1 Préparation des inocula des souches représentatives

1-1-1 Inoculum général

Les souches d'actinomycètes, conservées sur gélose inclinée de Bennett, sont ensemencées sur milieu gélosé de l'International *Streptomyces* Project N° 3 (ISP 3) (annexe). Les boîtes sont incubées à 30° C pendant 14 jours. A partir de ces boîtes, une suspension dense de fragments mycéliens et de spores est prélevée et introduite dans un flacon contenant de l'eau distillée stérile. Cet inoculum sert à l'ensemencement de tous les milieux utilisés, à l'exception du milieu ISP 9 (annexe) pour lequel on utilise un inoculum lavé (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

1-1-2 Inoculum lavé

Un Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu ISP1 (annexe) est inoculé à raison de 10 % (10^5 spores/ml), puis incubé pendant 72 heures à 30° C avec agitation (180 tr/min). La culture est centrifugée stérilement pendant 10 minutes à 10 000g. Le surnageant est écarté et le culot est lavé deux fois à l'eau distillée stérile puis repris dans 50 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension constitue l'inoculum lavé (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

1-2 Etude morphologique

1-2-1 Caractères culturels

Les caractères morphologiques et culturels sont déterminés sur des milieux de culture spécifiques (annexe) : ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5 recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966)**, le milieu Amidon-Caseine Agar, le milieu Nutrient Agar, le milieu de **Hickey et Tresner**, le milieu Glucose Asparagine, le milieu Glucose-Extrait de Levure-Peptone (**GLP**), le milieu Sporulation Agar, ainsi que le milieu Czapeck dox Agar. Les milieux sont coulés dans les boîtes de Pétri 36 heures avant leur utilisation, afin de diminuer l'humidité à la surface de la gélose et de contrôler leur stérilité. Ils sont ensuite ensemencés en stries à partir d'une goutte de l'inoculum déposée en bordure de la gélose. L'évaluation de l'importance de la croissance et du développement du

mycélium aérien sur chaque milieu est observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 30° C.

L'observation de la pigmentation du mycélium secondaire et du mycélium de substrat et la recherche de la présence dans la gélose de pigments diffusibles autres que les pigments mélanoides sont réalisées en même temps.

1-2-2 Aspect en microscopie optique

L'observation *in situ* de la morphologie des chaînes de spores et l'étude du mycélium aérien et du mycélium de substrat ont été effectuées selon la technique décrite par **Cross (1989)**. Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé (ISP2, ISP3 ou ISP4), de manière à former un angle d'environ 45 degrés. Une goutte de l'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu nutritif. Après 14 jours d'incubation à 30° C, la lamelle est retirée délicatement de la gélose. Elle est ensuite déposée sur une lame et examinée au microscope (Leica DMLS).

1-3 Etude chimiotaxonomique

Parmi les acides aminés constituant la paroi des actinomycètes, la glycine et l'acide diamino-2,6-pimélique (DAP) sont les marqueurs utilisés pour la classification de ce groupe bactérien. Les sucres caractéristiques des différents types de paroi sont l'arabinose, le galactose et le madurose.

Les différents isomères de l'acide diamino-2,6-pimélique (DAP), les aminoacides et les sucres de la paroi cellulaire sont déterminés par les techniques de **Becker et al., (1964)** et **Staneck et Roberts (1974)**.

1-3-1 Préparation des cellules

Les mycéliums des souches sélectionnées d'une culture de 4 jours sur ISP1 sont récupérés par centrifugation à 10 000g pendant 20 minutes. Après trois lavages à l'eau distillée, ils subissent un traitement à la potasse éthanolique à 0,5% pendant 24 heures à 37° C. Les cellules subissent alors un lavage à l'éthanol, suivi d'une centrifugation de 15 minutes à 10 000 g puis un séchage à 30° C (**Becker et al., 1964**).

1-3-2 Détermination des acides aminés des cellules entières

La forme LL, méso ou hydroxylée de l'acide 2,6-diaminopimélique (DAP) pariétal peut être déterminée simplement à partir d'un hydrolysate à chaud de 20 à 30

mg de cellules entières (HCL 6 N à 100° C pendant 18 heures) dans un tube scellé (**Becker et al., 1965**). L'hydrolysate est chromatographié sur couche mince de cellulose dans le système de migration : méthanol-eau-HCl-6 N-pyridine (40 : 13 : 2 : 5 volume/volume). Après séchage le chromatogramme est révélé par pulvérisation d'une solution acétonique à 0,2% de ninhydrine et chauffage à 100 °C pendant 5 minute (**Staneck et Roberts, 1974**). Les différentes formes de l'acide 2,6-diaminopimélique se caractérisent par une couleur vert olive.

1-3-3 Détermination des sucres

Les sucres de la paroi sont déterminés à partir de l'hydrolysate de 50 mg de cellules entières par l'acide sulfurique 2 N pendant 2 heures à 100° C dans un tube scellé. L'hydrolysate est neutralisé à pH 5.5 avec une solution de Ba(OH)₂ en présence de rouge de méthyle comme indicateur de pH. Le précipité de BaSO₄ obtenu est éliminé par centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est évaporé à sec. Le produit final est dissout dans 0.4 ml d'eau distillée. 0,2 µ l de l'hydrolysate, ainsi que les sucres témoins utilisés (glucose, arabinose, rhamnose et galactose) à 0,1 % (poids/volume) sont déposés sur une plaque de cellulose. Après séchage, une chromatographie ascendante est réalisée dans le système de solvant constitué de n-butanol-eau distillée-pyridine-toluène (10 : 6 : 6 : 1 volume/volume) (**Staneck et Roberts, 1974**). Les sucres sont révélés par pulvérisation du réactif d'aniline-acide phtalique suivie d'un chauffage à 100° C pendant 4 minutes.

1-4 Etude physiologique

1-4-1 Production de pigments mélanoides

La mise en évidence de la production de ces pigments mélanoides (pigments bruns diffusibles) est réalisée par culture de la souche sur les milieux ISP 6 et ISP 7. Les résultats sont appréciés après 48 heures d'incubation en comparaison avec les milieux témoins non ensemencés, mais incubés dans les mêmes conditions.

1-4-2 Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble selon la méthode de **Gordon et Smith (1953)**. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

1-4-3 Hydrolyse de la gélatine

Les souches sont ensemencées sur gélose nutritive contenant 0,4% de gélatine, puis incubées 14 jours à 30°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique à 15% est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine. (**Williams et Cross, 1971**)

1-4-4 Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**, et de **Gordon et Smith (1953)** sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. L'apparition de toute zone claire autour des colonies après 14 jours d'incubation à 30°C témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

1-4-5 Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de lait écrémé en poudre à 10% dans l'eau distillée sont ensemencés et incubés à 30°C. Des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation ou la peptonisation du lait provoquée par les souches (**Williams et Cross, 1971**).

1-4-6 Tolérance au chlorure de sodium

Ce test est réalisé sur milieu nutritif contenant 7% (poids/volume) de glycérol. A des tubes contenant 10 ml de ce bouillon, nous ajoutons des concentrations de NaCl (0 ; 3 ; 5 ; 6 ; 7 ; 9 et 10 %). Après ensemencement, les tubes sont incubés à 30°C pendant 14 jours sous agitation. Un trouble du milieu de culture témoigne de la croissance de la souche. La tolérance maximale au NaCl correspond au dernier tube présentant encore une croissance (**Tresner et al., 1968**).

1-4-7 Croissance à différentes températures des souches représentatives

Les souches actinomycétales isolées de l'eau de sebka et du sol de sebka sont ensemencées sur le milieu de culture Sporulation Agar, à raison de 3 boîtes de Pétri par souche pour chaque température d'incubation. La croissance est estimée pendant 21 jours d'incubation à 5° C, 20° C, 25° C, 27° C, 30° C, 37° C, 45° C et 55° C.

1-5 Etude biochimique

1-5-1 Utilisation de différents substrat carbonés

Cette étude est réalisée sur le milieu ISP 9 **Pridham et Gottlieb (1948)**. Les différentes sources de carbone testées sont les suivantes : D-xylose, inositol, D-mannitol, D-fructose, D-glucose, L-arabinose, L-rhamnose, saccharose, raffinose, galactose, D-mélibiose, cellulose et pectine.

Des solutions à 10% (Poids/volume) de ces sources de carbone sont stérilisées par filtration sur membrane Millipore (0,45 μ m) à l'exception de la cellulose et l'inositol qui sont stérilisés par immersion pendant une nuit dans l'éther éthylique. Ces derniers sont ensuite évaporés puis remis en suspension dans l'eau distillée (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Les différents substrats carbonés, stérilisés, sont ajoutés au milieu de base ISP9 en suspension de façon à obtenir une concentration finale de 1% (Poids/Volume). Après ensemencement et incubation de 3 semaines à 30° C, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celle obtenue sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif) et sur ISP9 contenant 1% de glucose (témoin positif).

1-5-2 Utilisation du citrate comme seule source de carbone

La pente du milieu de citrate de Simmons est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse de platine avec l'inoculum lavé de la souche. L'incubation s'effectue à 30° C. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine.

1-5-3 Réduction des nitrates

10 ml de bouillon nutritif contenant 0,1% de nitrate de potassium sont ensemencés et incubés à 30° C. Aux 5^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} jours d'incubation, 3 gouttes de chacun des réactifs de Griess I et II sont ajoutées à 1 ml de culture. (**Gordon et Smith, 1953**)

La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés s'il y a :

- apparition de la coloration rouge : les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche.
- absence de coloration : les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites.

1-5-4 Recherche de l'Uréase

4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu Urée-indole sont ensemencés par 0,5 ml de la souche. La lecture est effectuée après incubation à 30° C pendant 24 heures.

- Si la couleur du milieu vire vers le rouge donc Uréase positive
- Si la couleur du milieu reste jaune donc Uréase négative

1-5-5 Recherche de la production d'indole

4.5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu Urée-indole sont ensemencés par 0,5 ml de la souche. La lecture est effectuée après 24 heures d'incubation à 30° C. 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées à 1 ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface.

2- Identification moléculaire des souches représentatives

L'ADN est extrait selon la technique de **Provost *et al.* (1997)**. Chaque souche est identifiée au niveau de l'espèce par séquençage de gène (1400 paires de bases) de l'ADNr 16S. Après amplification génique (PCR) à l'aide des amorces SQ1 (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'), et SQ6 (5' CGGTGTGTACAAGGCC 3'). Après une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes suivie de 30 cycles de PCR à 94, 55 et 72°C pendant 30, 40 secondes et (1minute et 30 secondes) chacun respectivement suivie enfin par une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

Le produit d'amplification a été vérifié par électrophorèse pendant 2 heures à 90 volts dans un gel d'agarose à 3 % (Ultra pure, Bio-Rad Laboratories) en tampon TAE 1X additionné de 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium (**BT**) en présence d'un témoin de poids moléculaire 100 Base-Paire Ladder (Gibco-BRL). Après migration le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées (bande ~ 1400 paires de base).

Dans le cas de l'apparition de bandes parasites avec les bandes recherchées après électrophorèse, une purification est réalisée suivant les recommandations du fournisseur du Kit EZNA (Biofidal).

2-1 Séquençage

Le séquençage double brin a été effectué en utilisant les amorces SQ1, SQ2, SQ3, SQ4, SQ5 et SQ6. Il a été réalisé selon la méthode de Sanger adaptée par le kit de séquençage DYEterminator (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Enfin, c'est le séquenceur d'ADN ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, USA) qui a permis l'analyse des réactions de séquences.

2-2 Analyse des séquences

Les électrophorégrammes bruts sous le format Chromas ont été vérifiés un par un. Les couples des séquences sens/anti-sens ont fait l'objet d'un alignement multiple et progressif (Thompson *et al.*, 1994), avec le logiciel Clustal, pour vérifier la concordance des données et établir une séquence consensus. Cette dernière a été comparée à d'autres séquences procaryotiques dans la base de donnée Genbank à l'aide du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) afin d'établir le pourcentage d'identité de la souche d'intérêt avec les espèces les plus proches.

2-3 Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique consiste à évaluer les divergences entre plusieurs séquences : plus le nombre des substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est faible. L'arbre phylogénétique est une représentation des résultats obtenus. Les séquences ont été comparées avec celles disponibles dans les banques de données en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1997) pour déterminer l'affiliation phylogénétique.

2-4 Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques

Après avoir aligné les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme **Mega version 3.1** (Kumar *et al.*, 2004).

. Ce programme permet d'utiliser des méthodes mathématiques modélisant différentes hypothèses quant à l'évolution des gènes, et génère des arbres phylogénétiques représentant les relations entre organismes. Les topologies d'arbres obtenues par les différentes méthodes doivent être cohérentes et conduire à un arbre consensus. Les trois méthodes utilisées pour la construction d'arbres sont :

- la méthode du "**Neighbor joining**" (**Saitou et Nei, 1987**) : elle est la plus couramment utilisée en microbiologie. C'est une méthode de distance : elle est basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences "voisines" qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. C'est une méthode relativement rapide, qui génère un arbre selon l'évolution minimale et donne de bons résultats pour des séquences proches. Cependant elle n'est pas utilisable pour des séquences très éloignées, et elle traite toutes les substitutions de manière équivalente ce qui induit une perte d'informations. Comme dans toutes les méthodes de distance (ex : UPGMA), la méthode du "Neighbor joining" sous-estime le nombre d'évènements mutationnels car les substitutions sont simplement dénombrées et ne sont pas pondérées. Or des phénomènes de mutations multiples peuvent se produire. Différentes corrections ont été proposées pour tenter de corriger ce biais en faisant des hypothèses sur la façon dont les bases se sont substituées à un locus donné :

- La correction de Jukes et Cantor (**Jukes et Cantor, 1969**) suppose que toutes les substitutions ont une probabilité égale : les transitions purine ↔ purine (A ↔ G), pyrimidine ↔ pyrimidine (C ↔ T) ; et les transversions purine ↔ pyrimidine ont le même poids. Cette correction suppose aussi qu'il n'y a eu ni insertions, ni délétions. Elle donne des résultats satisfaisants avec des séquences proches.

- La correction de Kimura (**Kimura, 1980**) repose sur l'hypothèse que les transitions se produisent à des taux plus élevés que les transversions : le poids des transversions est double par rapport à celui des transitions.

- la méthode du **maximum de parcimonie** (**Fitch, 1971**) : cette méthode recherche parmi tous les arbres possibles celui qui correspond à une évolution minimale. Les regroupements sont ceux qui minimisent le nombre de mutations nécessaires pour expliquer les différences entre les séquences. Contrairement aux méthodes de distances qui réduisent le nombre de substitutions pour des séquences complètes, chaque site nucléotidique est considéré individuellement. Cette méthode implique que les sites évoluent indépendamment les uns des autres. De plus, les sites présentant des nucléotides identiques sont considérés comme "non-informatifs" et ne sont pas pris en compte dans le calcul ce qui réduit l'information. La durée de l'analyse croît de façon exponentielle avec le nombre de séquences, et n'est donc pas utilisable pour un grand nombre de séquences.

- la méthode du **maximum de vraisemblance** ("maximum likelihood") (**Felsenstein, 1981**) : c'est une méthode statistique où les changements évolutifs dans la

séquence nucléique suivent des modèles probabilistes. La probabilité de la substitution est calculée pour chaque position et pour chaque arbre. Cette méthode pondère de manière différente les événements de transitions et de transversions. L'arbre retenu sera celui dont les valeurs de longueurs de branches (estimées pour chaque position et chaque arbre sous un modèle évolutif donné) maximisent sa vraisemblance. Cette méthode ne suppose pas que l'évolution ait été parcimonieuse. C'est une méthode robuste qui permet de comparer des séquences très éloignées, mais nécessite un temps de calcul très long pour l'analyse d'un grand nombre de séquences.

Chaque méthode d'analyse phylogénétique comporte des avantages et des inconvénients, mais aucune n'intègre tous les aspects des mécanismes biologiques de l'évolution des séquences. Aucune de ces méthodes n'est donc susceptible de fournir un arbre phylogénétique "vrai". Les différentes méthodes peuvent fournir des topologies différentes, et on estime que seules les branches retrouvées par les 3 méthodes sont susceptibles d'être une bonne image de la réalité. Par ailleurs, la robustesse des arbres a été testée par la méthode du bootstrap (**Felsenstein, 1985**). Cette méthode d'analyse par échantillonnage permet d'évaluer la robustesse de chaque embranchement en donnant une mesure statistique de la confiance qui peut lui être attribuée. L'échantillonnage consiste à redistribuer les sites de façon aléatoire et à créer les topologies d'arbres correspondantes. L'opération est réalisée 100 à 1000 fois. La valeur de bootstrap d'un embranchement correspond à sa fréquence d'obtention sur les différentes topologies obtenues. Le groupe extérieur choisi ("outgroup") influence considérablement la topologie de l'arbre obtenu. L'"outgroup" doit être suffisamment distant des séquences étudiées pour permettre une bonne discrimination et un bon positionnement relatif, mais un "outgroup" trop éloigné risque de conduire à une topologie d'arbre "écrasée" (biais lié au phénomène d'attraction des longues branches (**Philippe, 2000**)).

ETUDE PRELIMINAIRE DES ANTIBACTERIENS
PRODUITS PAR LES SOUCHES REPRESENTATIVES

1- Choix du milieu optimal de production des antibactériens

Dans le but d'optimiser la croissance des souches et la production de métabolites à activité antibactérienne, nous avons testé différents milieux de culture avant de réaliser la culture en fermenteur. Pour cela les souches ont été cultivées sur six milieux différents (Bennett, GELM, AF, NPH, SF, et GBA) voir annexe. L'incubation dure 5 jours. L'activité antibactérienne est testée par la technique des cylindres d'agar, décrite dans la première partie de matériels et méthodes.

2- Etude de l'activité antibactérienne

2-1 Culture des actinomycétales à activité antibactérienne en milieu liquide

Trois millilitres (10^5 spores/ml) de chaque suspension sporale des souches actinomycétales sontensemencés dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 150 ml du milieu de bennett liquide. Les Erlenmeyers sont ensuite placés dans un bain marie thermostaté à 28° C et animés d'un mouvement de va et vient. Après 48 heures d'incubation, cette préculture est introduite stérilement dans un fermenteur de 2 litres contenant 1,5 litre de milieu de Bennett liquide. C'est un réacteur en verre borosilicate (Pyrex), autoclavable. Il est muni de plusieurs orifices assurant l'entrée et la sortie de l'air, la circulation d'eau thermostatée, l'introduction d'une sonde de pH et une sonde de température, et permettant l'arrivée de l'inoculum ainsi que le prélèvement du milieu de culture.

L'agitation est assurée par un arbre central et l'aération par le passage d'air filtré. L'agitation est de 250 t/min.

2-2 Préparation des surnageants et des extraits

A partir du temps zéro, des prélèvements de 20 ml de culture sont réalisés. La croissance des actinomycètes est suivie par la lecture à 623 nm de la densité optique des prélèvements dilués au 1/10 en eau distillée.

Un volume de 20 ml de jus de fermentation est centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est utilisé directement pour l'étude spectrophotométrique ou extrait par un volume égale d'alcool n-butylque. Quant au mycelium recueilli dans le culot est lavé 2 fois à l'eau distillée stérile, puis extrait pendant 2 heures sous agitation et à température ambiante, avec 5 ml de méthanol pur (**Lindenfelser *et al.*, 1964**). L'ensemble est centrifugé, dans les mêmes conditions décrites ci-dessus, afin de récupérer l'extrait méthanolique du mycélium.

2-3 Culture des actinomycétales à activité antibactérienne en milieu solide

0,1 ml des suspensions sporales des souches d'actinomycètes actives sont ensemencées en stries serrées sur les milieux de Bennett et incubées à 28° C pendant 7 jours. Des cylindres d'Agar de 3 mm de diamètre sont alors prélevés à l'emporte pièce et déposés à la surface du milieu de Mueller-Hinton (Merck) préalablement ensemencé par les bactéries-tests afin de vérifier la présence de substances bioactives. Les boîtes sont alors placées à 4°C pendant 4 heures, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Dans le cas positif (présence d'activité) les cylindres d'agar des différentes cultures sont extraits pendant 7 jours à température ambiante et sous agitation avec 50 ml de différents solvants (Chloroforme, hexane et isoamylacétate).

2-4 Technique des disques

Des disques stériles non imprégnés (Sanofi diagnostics Pasteur) de 6 mm de diamètre reçoivent 20 µ l des extraits méthanolique de mycélium ou butanolique de surnageant ou des extraits chloroformique, hexanoïque et isoamylacétique des cultures solides et des disques témoins reçoivent 20 µ l des différents solvants purs. Après séchage sous courant d'air chaud les disques sont déposés sur les boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par écouvillon selon la technique de la NCCLS avec les souches tests. Avant l'incubation à la température optimale de croissance de chaque souche test, les boîtes sont laissées 2 heures à + 4 °C pour permettre une pré-diffusion des substances bio-actives (**Tortorano et al., 1979**). La lecture des résultats est réalisée après 24 heures. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

2-5 Technique des puits

A l'aide d'un emporte-pièce, des puits de 3 mm de diamètre chacun sont creusés dans le milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par écouvillon selon la technique de la NCCLS avec les microorganismes tests. Une quantité de 20 µ l des surnageants des cultures liquides des actinomycètes est déposée dans chaque puit. Les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres d'inhibitions sont mesurés et notés.

TABLEAU N°12a : Classification des antibiotiques en classes selon **Betina, 1965**.

Valeurs des R_F dans les systemes de solvants principaux	I	II	III	IV	V
R_{F1}	> 0	$>0,6$	0,31-0,6	0-0,3	0-1
R_{F2}	0-0,3	$>0,3$	$>R_{F1}$	$>R_{F1}$	$>0,6$
R_{F3}	0	>0	$>R_{F4}$	$\geq R_{F4}$	$>0,6$
R_{F4}	0	0	0-0	0-0	$>0,6$

TABLEAU N°12b : Classification des antibiotiques en classes selon **Betina, 1965**.

Valeurs des R_F dans les systemes de solvants principaux	Classe I		
	Ia	Ib	Ic
R_{F1}	$>0,6$	0,31-0,6	$\leq 0,3$
Valeurs des R_F dans les systemes de solvants principaux	Classe II		
	IIa	IIb	IIc
	$R_{F1} > R_{F2} > R_{F3}$	$R_{F1} > R_{F2} < R_{F3}$	$R_{F1} < R_{F2} < R_{F3}$
Valeurs des R_F dans les systemes de solvants principaux	Classe III		
	IIIa	IIb	
R_{F4}	0	0,05-0,6	
Valeurs des R_F dans les systemes de solvants principaux	Classe IV		
	IVa	IVb	IVc
R_{F2}	$> R_{F1}$	$>R_{F1}$	$>R_{F1}$
R_{F3}	$>R_{F1}$	0	$>R_{F4}$
R_{F4}	0	0	0,05-0,6
Valeurs des R_F dans les systemes de solvants principaux	Classe V		
	Va	Vb	Vc
R_{F1}	$> 0,6$	0,31-0,6	0-0,3

3- Séparation des molécules bioactives

3-1 Chromatographie ascendante sur papier (Bétina, 1965)

Nous avons utilisé des bandellette de papier Watman N° 2 (35 x 1 cm). Les dépôts des différents extraits ont été réalisé sous forme de spots placés à 3 cm du bord inférieur de la bandellette et à partir de 0,5 cm des bords lateraux. 20 μ l des extraits sont déposés progressivement à l'aide d'une seringue et sont séchés sous courant d'air chaud entre chaque application.

Les cuves circulaires utilisées contiennent 50 ml de système éluant. L'atmosphère des cuves est saturée pendant 2 heures avec la vapeur du solvant choisi avant d'y introduire les bandellettes. Après 15 cm de distance parcourue par le solvant à partir du point de départ la chromatographie est arrêtée. Le solvant est éliminé soit par simple évaporation à température ambiante soit sous courant d'air chaud.

3-2 Système éluant

Dans une première étapes les systèmes de solvants principaux (Bétina, 1965) suivants sont utilisés pour l'analyse chromatographique des principes actifs produits par les souches actinomycétales.

- a) Eau distillée
- b) n-butanol saturé à l'eau
- c) Ethyl acétate saturé à l'eau
- d) Toluène saturé à l'eau

Selon Bétina (1965) les antibiotiques sont classés en 5 classes et 14 sous classes selon leurs valeurs de r_f dans les principaux systèmes de solvants **tableau 12a et 12b**.

3-3 Bioautographie des molécules bioactives

A l'inverse des méthodes chimiques particulières à chaque classe d'antibiotiques et qui ne peuvent être mises en œuvre qu'une fois connues leurs réactions colorées, la révélation des antibiotiques par voie microbiologique présente un caractère absolument général, puisqu'il consiste à mettre en contact le chromatogramme dans une boîte de Pétri avec le milieu de Mueller Hinton préalablementensemencé avec les bactéries-tests et à l'incuber pendant 24 heures à 37°C.

Pour ce faire, 12 ml du milieu de Mueller Hintonensemencé par un inoculum calibré de 10⁶ UFC/ml de bactéries-tests sont coulés dans une boîte de Pétri de 90 mm

de diamètre. Les chromatogrammes sont alors déposés délicatement à la surface de la gélose. Après 2 heures à 4°C, les chromatogrammes sont retirés, et les boîtes sont incubées à 37 °C. Les zones d'inhibitions ont été notées après 24 heures d'incubation.

4- Etude spectrale des molécules bioactives

4-1 Spèctre UV-Visible des molécules bioactives

L'absorption entre 220 et 600 nm (**Ouhdouch *et al.*, 2001**) des extraits actifs est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam de type « Helios » contre du méthanol pour les extraits méthanolique et contre le chloroforme pour les extraits chloroformique. Les mesures ont été réalisées dans des cuves en quartz avec un trajet optique de 1 cm. L'appareil est relié à un ordinateur et piloté par le logiciel vision.

4-2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Pour évaluer qualitativement les molécules bioactives produites, un appareil de chromatographie liquide haute performance (HPLC Shimadzu) a été utilisé. L'HPLC est une technique qui permet de séparer les mélanges liquides en fonction de leur différence de solubilité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

- L'éluant est un mélange d'eau et de méthanol dont les rapports étaient ajustés à 40%/60% et 50%/50% respectivement.

- La colonne d'analyse est une colonne C18 (NUCLEOSIL 100⁻⁵) de longueur 25 cm et de diamètre 4,6 mm. Le débit utilisé dans la colonne est de 1ml/mn.

- La pompe utilisée est une pompe LC8A

- La détection a été réalisée au moyen d'un spectrophotomètre ultraviolet à longueur d'onde variable « SPDM 10AVP »

- La longueur d'onde de détection a été fixée à 220 nm.

- Le traitement des données se fait par un ordinateur couplé à l'HPLC à l'aide du logiciel ClassVP.

5- Etude de la stabilité de l'activité antibactérienne

4-2 Stabilité en fonction de la température

Des fractions de 5 ml des extraits actifs de chaque souche d'actinomycètes ont été soumises à un traitement par différentes températures : 15 min à 100°C, 30 min à 70°C et 30 min à 50°C. Elles ont ensuite été testées par la technique des disques et l'activité a été comparée à celle obtenue avec les extraits sans traitement.

4-2 Stabilité en fonction de la température

Des fractions de 5 ml des extraits actifs de chaque souche d'actinomycètes ont été exposées à l'action d'une lampe d'une puissance de 100 W, placée à une hauteur de 50 cm. Après un temps d'exposition de 24 heures l'activité des différents extraits a été testée par la technique des disques et l'activité a été comparée à celle obtenue avec les extraits sans traitement.

4-2 Stabilité en fonction de la température

Des fractions de 5 ml des extraits actifs de chaque souche d'actinomycètes ont été placées au congélateur à -20°C et d'autres sont placées à température ambiante et à l'obscurité pendant 24 heures. Après décongélation des extraits congelés à température ambiante l'activité des différents extraits a été testée par la technique des disques et l'activité a été comparée à celle obtenue avec les extraits sans traitement.

Résultats et discussion

Mise au point d'un protocole d'isolement, étude de la diversité des actinomycètes dans les écosystèmes explorés et mise en évidence de l'activité antibiotique

TABLEAU N°13a : Nombre d'actinomycètes isolés d'échantillon de sol de sebkha

Echantillon	Milieux de culture	Nombre d'actinomycètes x 10 ⁵ UFC/g	
Sol de sebkha non traité avec du CaCO ₃	Milieux sans antibiotiques	GLM	00,401
		Glucose-Asn	00,673
		Bennett	00,383
	Milieux avec antibiotiques	GLM	03,665
		Glucose-Asn	01,676
		Bennett	01,011
Sol de sebkha traité avec du CaCO ₃	Milieux sans antibiotiques	GLM	02,407
		Glucose-Asn	00,033
		Bennett	02,330
	Milieux avec antibiotiques	GLM	07,056
		Glucose-Asn	01,473
		Bennett	02,900

TABLEAU N°13b : Nombre d'actinomycètes isolées d'échantillon d'eau de sebkha

Echantillon	Milieux de culture	Nombre d'actinomycètes x 10 ⁴ UFC/g	
Eau de sebkha non traitée avec du phénol	Milieux sans antibiotiques	GLM	00,343
		Glucose-Asn	00,006
		Bennett	contaminé
	Milieux avec antibiotiques	GLM	03,833
		Glucose-Asn	00,033
		Bennett	02,343
Eau de sebkha traitée avec du phénol	Milieux sans antibiotiques	GLM	00,240
		Glucose-Asn	00,020
		Bennett	01,333
	Milieux avec antibiotiques	GLM	01,756
		Glucose-Asn	04,666
		Bennett	03,666

1- Résultats

1-1- Isolement des souches actinomycétales

Au bout de 7 jours d'incubation à 28° C, les actinomycètes apparaissent, et se développent lentement. Elles sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique, dénombrées et purifiées afin d'obtenir des cultures pures pour la conservation. L'isolement des bactéries actinomycétales à partir des échantillons traités ou non sur les trois milieux de culture (GLM, Bennett et Glucose-asparagine) complémentés ou non en antibiotiques a conduit aux résultats rassemblés dans les **tableaux 13a et 13b**.

Les résultats présentés dans ses tableaux font apparaître que le nombre total de colonies actinomycétales dénombrées varie entre $0,03 \cdot 10^5$ et $7,05 \cdot 10^5$ UFC par gramme de sol et de $0,06 \cdot 10^3$ à $4,66 \cdot 10^4$ UFC par ml d'eau. Le plus grand nombre d'actinomycètes est isolé à partir des échantillons traités (**CaCO₃** pour les échantillons de sols et le **phénol** pour les échantillons d'eau) sur l'ensemble des milieux de culture utilisés. Il est de $16,199 \cdot 10^5$ UFC par gramme de sol traité contre $7,809 \cdot 10^5$ UFC par gramme de sol non traité. Pour les échantillons d'eau, il est de $11,68 \cdot 10^4$ UFC/ml d'eau traitée contre $6,55 \cdot 10^4$ UFC/ml d'eau non traitée.

Il apparaît aussi que le nombre de souches actinomycétales isolées sur les milieux complémentés en antibiotiques est nettement supérieur à celui obtenu sur les milieux non complémentés en antibiotiques. Ainsi $1,45 \cdot 10^5$ UFC/gramme de sol non traité ont été isolées sur les milieux non complémentés en antibiotiques contre $6,35 \cdot 10^5$ UFC/gramme de sol non traité sur les milieux de culture complémentés en antibiotiques et $6,21 \cdot 10^4$ UFC/ml d'eau non traitée ont été isolées sur les milieux complémentés en antibiotiques contre $3,35 \cdot 10^4$ UFC/ml d'eau non traitée sur les milieux non complémentés en antibiotiques.

Pour les échantillons traités, $4,77 \cdot 10^5$ UFC/gramme de sol et $1,57 \cdot 10^4$ UFC/ml d'eau ont été dénombrées sur les milieux de culture non complémentés en antibiotiques contre $11,42 \cdot 10^5$ UFC/gramme de sol et $10,08 \cdot 10^4$ UFC/ml d'eau sur les milieux de culture complémentés en antibiotiques.

D'après les résultats présentés dans les mêmes **tableaux 13a et 13b**, il apparaît que les milieux de culture (GLM et Bennett) permettent l'isolement d'un nombre considérable d'actinomycètes par rapport au milieu Glucose Asparagine.

A la lumière des résultats obtenus, le protocole suivant pour l'isolement des actinomycètes a été adopté :

Tableau 14 : Criblage initial des souches d'actinomycètes (culture en milieu gélosé)

Echantillon	Lieu de prélèvement	Nombre de souches d'actinomycètes isolées	Nombre d'actinomycètes à activité antibactérienne et/ou antifongique
1	Sol de sebkha (Ain M'lila)	08	05
2	Eau de sebkha de (Ain M'lila)	04	03
3	Eau de lac (Constantine)	03	02
4	Ecorces d'arbres (Constantine)	10	04
5	Eau de source thermale (Guelma)	00	00
6	Eau de source thermale (Bniharoun)	04	00
7	Sol de montagne (Constantine)	16	03
Total		45	17

- Traitement des échantillons de sols par le CaCO₃ (0,1 g/gramme de sol) et l'incubation pendant 7 jours à 28° C dans une atmosphère saturée d'humidité.

- Agitation des échantillons d'eau en présence de phénol à 7 mg/ml pendant 10 minutes suivi d'une filtration à travers une membrane millipore (0,45 µm), puis une agitation des membranes avec des billes de verres stériles de 4 mm de diamètre dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/l).

- Isolement des actinomycètes par ensemencement sur trois milieux de culture (GLM, Glucose-asparagine et Bennett) complémentés ou non en amphotéricine B à 75 µg/ml et en polymixine à 10 µg/ml.

En ce qui concerne les écorces d'arbres, la méthode classique pour ces échantillons a été utilisée, à savoir : broyage de dix grammes de chaque échantillon, mise en suspension des broyats dans de l'eau physiologique puis agitation vigoureuse à l'aide d'un vortex pendant 10 minutes.

Quarante Cinq colonies différentes d'actinomycètes ont été isolées et purifiées (**Tableau 14**). Ces résultats font apparaître une variation importante du nombre de souches actinomycétales isolées à partir de chaque échantillon. Sur l'ensemble des 45 souches isolées, 24 proviennent des échantillons telluriques (sol de sebkha et sol de Djebel El-Ouahch), 10 souches des écorces d'arbres (cèdre et chêne vert) et 11 souches des échantillons d'eau (eau de sebkha, eau de lac et eau de source thermale).

1-2- Diversité des actinomycètes isolés

La PCR a été réalisée sur 22 isolats en utilisant des amorces universelles (91E et 16S) qui servent à amplifier la zone conservée du gène *rrn* codant pour l'ARNr 16S. L'amplification était positive et des fragments de 479 pb ont été obtenus et séquencés. Les chromatogrammes bruts (**Figure 19**) ont été analysés par le logiciel **chromas 2.23** (Technelysium Pty Ltd, Tewantin Australie) (**Figure 20**). La comparaison de ces séquences avec celles disponibles au niveau du gène bank nous a permis d'évaluer la diversité phylogénétique et la position taxonomique de ses isolats à l'aide du logiciel **Mega** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) **version 3.1** (**Kumar et al., 2004**). Les résultats obtenus sont présentés sur l'arbre phylogénétique de la **figure 21**.

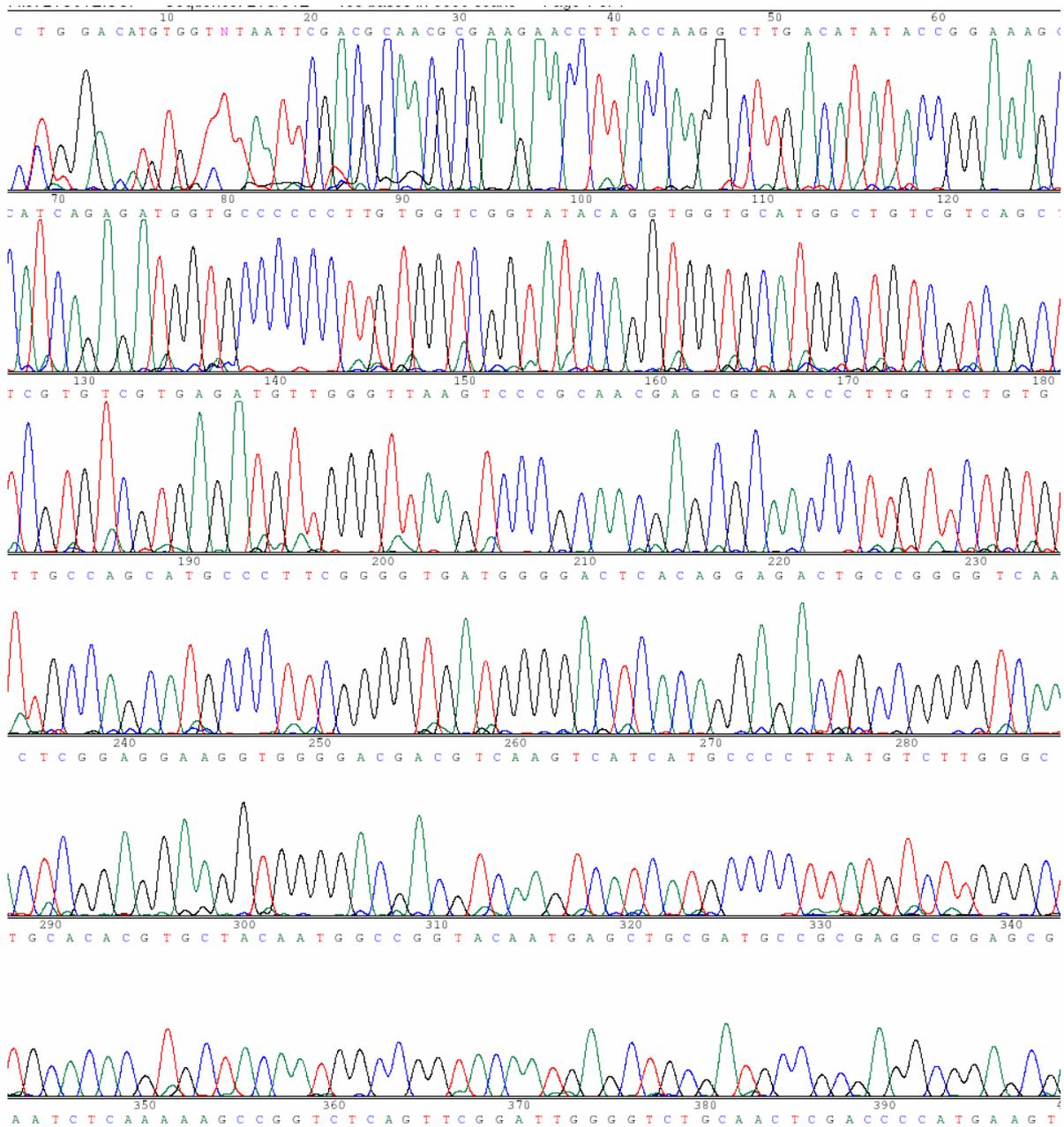


FIGURE N°19 : Chromatogramme sous format chromas (souche SS4)

CTGGACATGTGGTTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGA
 CATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGG
 TGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA
 ACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGG
 ACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
 AGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTAC
 AATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAG
 TTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATC
 GCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCA

FIGURE N°20 : Séquence de la souche SS4 après traitement par le logiciel **chromas** 2.23 (Technelysium Pty Ltd, Tewantin Australie)

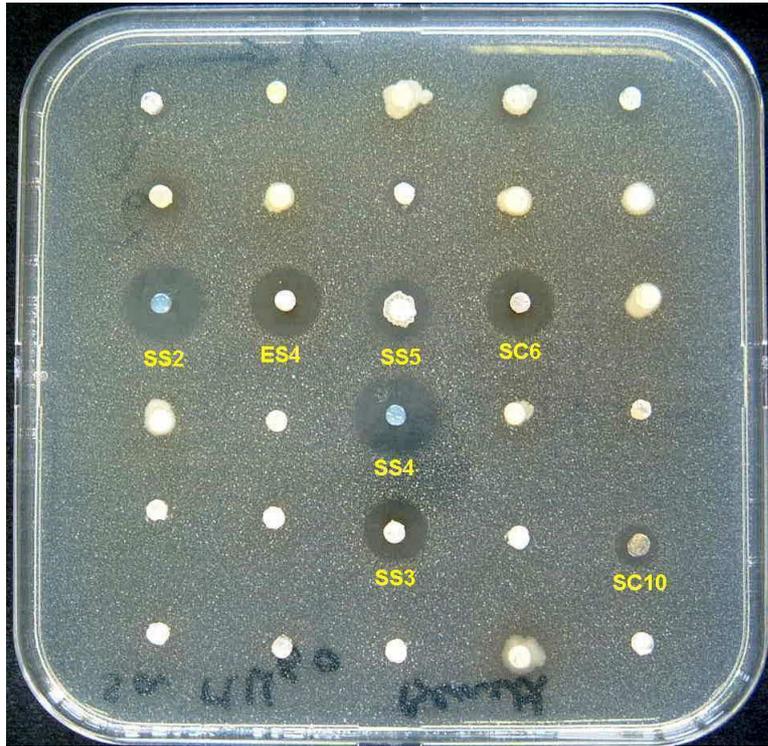


FIGURE N°22a : Test d'activité des souches actinomycétales isolées cultivées sur le milieu de Bennett contre *Staphylococcus aureus* Mu 50 par la technique des cylindres d'agar.

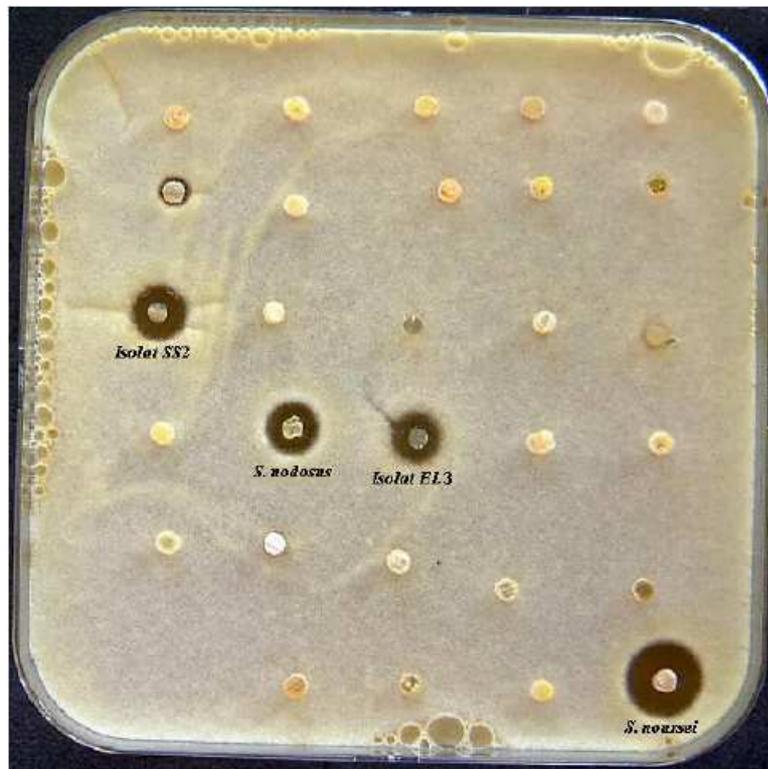


FIGURE N°22b : Test d'activité des souches actinomycétales isolées cultivées sur le milieu GLM contre *Aspergillus niger* ATCC 16404 par la technique des cylindres d'agar.

1-3- Tests d'activité

L'activité antibactérienne et antifongique des souches actinomycétales isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar et la technique des puits. Les deux techniques sont des méthodes de diffusion en milieu gélosé. Seule la première technique nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches testées vis-à-vis des bactéries-tests et champignons-tests utilisés (**Figures 22a et 22b**).

Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 15**, d'où il en ressort que sur les **45** isolats, seules **17** souches d'actinomycètes soit **37,78 %** sont actives sur au moins une des bactéries-tests étudiées.

Les souches **SS2** et **SS4** isolées du sol de sebkha et la souche **SC10** isolée du sol de Constantine ont montrées une activité contre toutes les bactéries testées. La souche **SC6** isolée du sol de Djebel El-Ouahch inhibe toutes les bactéries testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Les deux souches **EC1** et **EC3** agissent seulement sur les bactéries à coloration de Gram positive. Les deux souches **ES3** et **EL2** sont actives contre *Escherichia coli* ATCC 25922 seulement, alors que les deux souches **SS6** et **EC6** inhibent uniquement *Proteus vulgaris* ATCC 13315. Seule la souche **EC5** présente une activité vis à vis de *Staphylococcus aureus* Mu 50 (Hôpital Juntendo, Tokyo, Japon).

Le **tableau 16** présente les résultats du test antifongique en présence des deux souches actinomycétales de références, *Streptomyces noursei* NRRL B-1714 et *Streptomyces nodosus* NRRL B- 2371. Seules les deux souches **SS2** et **EL3** présentent une activité vis à vis des champignons testés. Le comportement antifongique de nos deux isolats est différent de celui des souches de références. La souche **SS2** est active contre les six champignons testés, alors que la souche **EL3** ne montre pas une activité contre *Aspergillus fumigatus* UMIP 1082.74 et *Fusarium oxysporum* UMIP 625.72.

Enfin, on note **l'intense activité antimicrobienne** de la souche **SS2** qui a montrée une activité inhibitrice vis-à-vis de toutes les bactéries et champignons étudiés.

Le taux d'isolement des actinomycètes à activité antibactérienne était de **37,78 %** (**tableau 17**) tandis que celui des actinomycètes a activité antifongique était de **4,44 %** (**Tableau 18**). L'activité la plus intense a été obtenue avec les souches cultivées sur le milieu de culture Bennett (**Tableaux 17 et 18**).

TABLEAU N°15 : Activité antibactérienne des actinomycètes isolés

Souches isolées	Lieu de prélèvement	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>S. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. aureus</i> Mu 50	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
SS2	Sol de sebkha	+	+	+	+	+	+
SS3	Sol de sebkha	-	+	-	+	+	-
SS4	Sol de sebkha	+	+	+	+	+	+
SS5	Sol de sebkha	+	-	-	-	+	+
SS6	Sol de sebkha	-	+	-	-	-	-
ES2	Eau de sebkha	-	-	-	+	-	+
ES3	Eau de sebkha	+	-	-	-	-	-
ES4	Eau de sebkha	-	+	-	-	+	+
EL2	Eau de lacs	+	-	-	+	-	-
EL3	Eau de lacs	+	-	-	+	-	+
EC1	Ecorces du Cèdre	-	-	-	+	+	+
EC3	Ecorces du Cèdre	-	-	-	+	+	+
EC5	Ecorces du Cèdre	-	-	-	-	+	-
EC6	Ecorces du Cèdre	-	+	-	-	-	-
SC1	Sol de Constantine	-	+	-	+	-	+
SC6	Sol de Constantine	+	+	-	+	+	+
SC10	Sol de Constantine	+	+	+	+	+	+

+ : Inhibition positive (diamètre d'inhibition > 3 mm)

- : pas d'inhibition (diamètre d'inhibition = 3 mm)

TABLEAU N°16 : Activité antifongique des actinomycètes isolés

Souches d'actinomycètes	Lieu de prélèvement	<i>C. albicans</i> UMIP 48.72	<i>C. albicans</i> UMIP 884.65	<i>C. tropicalis</i> R ₂ UMIP 1275.81	<i>A. fumigatus</i> UMIP 1082.74	<i>A. niger</i> ATCC 16404	<i>F. oxysporum</i> UMIP 625.72
SS2	Sol de sebkha	+	+	+	+	+	+
EL3	Eau de lac	+	+	+	-	+	-
<i>Streptomyces noursei</i> NRRL B-1714	-	+	+	-	+	+	+
<i>Streptomyces nodosus</i> NRRL B-2371	-	+	+	-	+	+	+

+ : Inhibition positive (diamètre d'inhibition > 3 mm)

- : pas d'inhibition (diamètre d'inhibition = 3 mm)

Tableau 17 : Pourcentage des souches d'actinomycètes à activité antibactérienne cultivées sur les milieux GLM et Bennett.

		Nombre (%) des actinomycetes actives contre					
Technique utilisée	Milieu de culture des actinomycètes actives	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>S. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. aureus</i> Mu 50	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Cylindre d'agar	Bennett	6 (13,33)	6 (13,33)	3 (6,67)	8 (17,78)	8 (17,78)	9 (20)
	GLM	4 (8,89)	8 (17,78)	2 (4,44)	5 (11,11)	5 (11,11)	8(17,78)
	Total	8 (17,77)	9 (20)	3 (6,66)	10 (22,22)	10 (22,22)	11 (24,44)

Tableau 18: Pourcentage des souches d'actinomycètes à activité antifongique cultivées sur les milieux GLM et Bennett.

		Nombre (%) des actinomycetes actives contre					
Technique utilisée	Milieu de culture des actinomycètes actives	<i>C. albicans</i> UMIP 4872	<i>C. albicans</i> UMIP 88465	<i>C. tropicalis</i> R ₂ UMIP 127581	<i>A. fumigatus</i> UMIP 108274	<i>A. niger</i> ATCC 16404	<i>F. oxysporum</i> UMIP 62572
Cylindre d'agar	Bennett	1 (4)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	1 (4)
	GLM	2 (8)	2 (8)	2 (8)	1 (4)	2 (8)	1(4)
	Total	2 (8)	2 (8)	2 (8)	1 (4)	2 (8)	1 (4)

2- Discussion

Cette étude a été menée dans le but de mettre en évidence la présence des actinomycètes dans divers écosystèmes et de sélectionner les souches à activité antibactérienne.

Les écosystèmes étudiés dans ce travail ont été choisis soit pour une de leur caractéristique physique ou chimique extrême soit pour leur nature singulière :

- La Sebka de Ain M'lila, le mot sebka est un terme de langue arabe qui sert à désigner une dépression (parfois une zone plate) occupée par un lac, en général, salé.

- Le sol de la Sebka semi-aride, de nature sablonneuse, dépourvue ou presque de végétation et présentant un taux de salinité élevé.

- La montagne de Djebel El Ouahch, d'une altitude de 1 200 m a été retenue pour la richesse de sa flore et sa dense végétation (donc très riches en humus) et ses vieux arbres de Chêne, arbre appartenant au genre *Quercus*, famille des *Fagaceae* et de cèdre qui est un arbre du genre *Cedrus* de la famille des *Pinaceae*.

- Les lacs fermés de cette même montagne.

- Les sources thermales de Guelma et Bni Haroun ont été choisies pour la température élevée de leur eau environ 80° C.

L'isolement des bactéries actinomycétales productrices de substances bioactives à partir d'écosystèmes extrêmes nécessite une méthode performante pour leur sélection. Les actinomycètes rares sont présents en faible quantité dans les différents écosystèmes et ne peuvent être isolées par les méthodes courantes utilisées en microbiologie. Leur sélection doit passer par l'élimination des microorganismes qui, par leurs facultés d'invasion, gênent la croissance des actinomycètes. Le rapport actinomycètes/microorganismes d'un échantillon augmente soit :

- par prétraitement chimique à titre d'exemple le carbonate de calcium et le phénol ou physique comme la centrifugation différentielle des échantillons (**Cavalla et Eberlin, 1994 ; Alferova et Terekhova, 1988 ; El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**),

- par l'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote (amidon, chitine, glycérol, caséine, arginine, asparagine) rendant les milieux moins favorables à la croissance des bactéries autres que actinomycétales (**Cavalla et Eberlin, 1994**),

- ou encore par l'emploi de substances antibiotiques qui permettent d'inhiber le développement des flores bactériennes fongiques et antagonistes (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990 ; Alferova et al., 1989 ; Takizawa et al., 1993**).

Dans ce but, nous avons mis au point une méthode d'isolement des bactéries actinomycétales à partir d'échantillons d'origine diverses qui ont subi différents prétraitements. Les échantillons de sol ont été traités par du CaCO₃ (0,1g/gramme de sol) et incubés pendant 7 jours à 28° C. dans une atmosphère saturé d'humidité. Les échantillons d'eau sont agités pendant 10 minutes en présence de phénol (7 mg/ml) suivie d'une filtration à travers une membrane millipore (0,45 µm). Enfin les membranes sont agitées en présence des billes de verres stériles de 4 mm de diamètre dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g/l). Les écorce d'arbres sont broyés (10g) et suspendus dans de l'eau physiologique, puis agités vigoureusement au vortex pendant 10 minutes.

L'ensemencement des différents échantillons a été effectué sur trois milieux de culture (GLM, Glucose-asparagine et Bennett) complémentés ou non en amphotéricine B à raison de 75 µg/ml et en polymixine à raison de 10 µg/ml. Cela a conduit, d'une part, à une augmentation considérable du nombre des colonies d'actinomycètes isolées par rapport au témoin non traité (**Tableaux 13a et 13b**) et d'autre part, à une diminution de la flore fongique et des bactéries à croissance rapide. Ces résultats corroborent ceux de **Alferova et Terekhova (1988)** qui ont montré que le traitement des échantillons avec du CaCO₃ favorise la sporulation et par conséquent augmente considérablement (jusqu'à 100 fois) le nombre des actinomycètes par rapport aux témoins non traité. En même temps, se produit une diminution de la flore fongique. Quant aux bactéries, la plupart ont été éliminée par l'étape de séchage de l'échantillon (**Cavalla et Eberlin, 1994**). En effet, le traitement du sol avant isolement par le séchage, le stockage et le chauffage, utilise la grande résistance des arthrospores vis-à-vis des conditions de sècheresse et de températures se qui conduit à une augmentation sensible du nombre de *Streptomyces*. **El-Nakeeb et Lechevalier (1963)** ont mis en évidence que le traitement des échantillons d'eau par le phénol diminue le nombre des bactéries autres que les actinomycètes. Par ailleurs, l'addition d'antifongique et d'antibactérien contre les bactéries à coloration de Gram négative aux milieux de culture entraîne une augmentation du nombre de bactéries actinomycétales isolées (**Takizawa et al., 1993**).

Les **Tableau 13a et 13b** font apparaître également que les milieux GLM et Bennett permettent l'isolement d'un nombre plus important d'actinomycètes par rapport au Glucose-asparagine, cela peut être expliquée par la richesse des deux premiers milieux en matière organique (sources de carbone et d'azote) par rapport au troisième milieu.

Afin d'éviter toute influence considérable sur la variation des genres actinomycétales isolés, le milieu glucose asparagine a été, également, retenu malgré le nombre faible d'actinomycètes isolé sur ce milieu.

Malgré toutes les précautions prises, quelques colonies de champignons ont pu croître, ceci peut être expliquée par le fait que l'amphotéricine B n'est pas un antifongique à large spectre de plus il existe des champignons résistant à ce dernier d'où la nécessité d'utiliser des antifongiques à larges spectres ou une combinaison d'antifongiques.

Le problème délicat lors de l'isolement des actinomycètes reste le développement des bactéries à coloration de Gram positive dont la croissance est envahissante, comme les bactéries du genre *Bacillus* qui forment des plages rendant toute observation et purification difficile voire, même, impossible. L'addition d'antibiotiques anti-Gram positif permet de réduire de façon considérable le nombre de ces bactéries, mais ces antibiotiques ne sont pas sans effets sur les actinomycètes qui appartiennent au groupe des bactéries à coloration de Gram positive.

Plusieurs auteurs, à juste titre, considèrent que l'emploi d'antibiotiques est une précaution essentielle dans l'isolement des actinomycètes. D'autres, combinent un prétraitement chimique ou physique des échantillons avec l'addition des antibiotiques. Mais cette technique d'isolement influence considérablement la variation des genres actinomycètes isolés et peut être utilisée pour un isolement ciblé et spécifique de genre. À cet effet, **Larpent et Larpent-Gourgaud (1990)** utilisent pour isoler les genres *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora* et *Streptosporangium* un milieu de culture complété avec 50 µg/ml de cycloheximide, 50 µg/ml de nystatine, 5 µg/ml de polymyxine et 1-8 µg/ml de pénicilline. Afin de cibler le genre *Thermoactinomyces* ils utilisent un milieu supplémenté de cycloheximide à une concentration de 50 mg/ml et de 25 mg/ml de novobiocine. Enfin, pour obtenir les genres *Micromonospora* et *Nocardia* ils additionnent 75 mg/ml de cycloheximide et 75 mg/ml de nystatine au milieu de culture utilisé.

Les résultats rassemblés dans le **tableau 14** font apparaître une variation importante du nombre de souches d'actinomycètes isolées à partir de chaque échantillon sur les trois milieux sélectifs. Sur l'ensemble des 45 souches d'actinomycètes isolées et purifiées **24** souches soit **53,33 %** proviennent des échantillons tellurique (le sol de Djebel El-Ouahch et le sol de sebkha) **10** souches soit **22,22 %** des écorces d'arbres et **11** souches soit **24,44 %** des échantillons d'eau. La présence d'un nombre élevé d'actinomycètes dans le prélèvement du sol et d'écorces d'arbres est en accord avec les données bibliographiques qui laissent apparaître le sol comme le principal réservoir d'actinomycètes.

Après extraction des acides nucléiques à partir des colonies d'actinomycètes, les ADNr 16S ont ensuite été amplifiés à l'aide des amorces universelles 91E (3'TCAAAGAATTGACGGGGGC5') et 16S₂ (5'GCCCCGGAACGTATTAC3') (Relman *et al.*, 1992) qui permettent l'amplification d'un fragment de 479 pb, fragment situé entre les nucléotides 916 et 1393 qui correspondent à la région conservée du gène *rrn* qui code pour le 16S rRNA (Heym *et al.*, 2005). Le séquençage des fragments (Figures 19 et 20) obtenus permet d'accéder à la diversité des actinomycètes présents dans les échantillons étudiés.

L'analyse des séquences obtenues nous a permis à l'aide du logiciel **Mega** de construire l'arbre phylogénétique présenté sur la **figure 21**, d'où il ressort que les actinomycètes isolés sont classés dans le phylum des *Actinobacteria*, la classe V des *Actinobacteridae* et l'ordre I des *Actinomycetales* et sont réparties sur trois genres différents, *Streptomyces* et *Actinomadura* qui font partie du sous ordre des *Streptomycineae* et le genre *Nocardia* qui fait partie du sous ordre des *Corynebacterineae*. L'isolat **SS5** présente une forte similitude avec *Actinomadura myerii*, les isolats **SC14** et **SC8** ont montré une grande similarité, respectivement, aux souches *Nocardia brevicatena* ATCC 15333^T et *N. elegans* IMMIB N-402^T. Les isolats affiliés au genre *Streptomyces* forment six groupes phylogénétiques différents sur l'arbre phylogénétique de la **figure 21**.

Le plus grand groupe phylogénétique comprend cinq isolats (**SS1**, **SC10**, **EL3**, **ES2** et **SS4**) qui se sont placés sur la même branche phylogénétique que *S. caviescabies* (Goyer, 1997), *S. mediolani* qui fait partie de la III^{ème} catégorie du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (espèce indépendante de la série jaune) selon la classification de Williams *et al.*, (1989), et *S. setonii*, espèce synonyme de l'espèce représentative du sous groupe de *S. anulatus* qui fait partie de la première catégorie des bactéries appartenant au genre *Streptomyces* selon la classification de Williams *et al.*, (1989).

Le deuxième groupe phylogénétique est composé des isolats **SC6** et **ES4** qui occupent la même branche phylogénétique avec *S. viridobruneus*. Les isolats **ECH2** et **ECH3** se sont groupés avec *S. laurentii* qui appartient au groupe des espèces indépendantes du genre des *Streptomyces* de la série rouge formant ainsi le troisième groupe phylogénétique. L'isolat **SS7** est affilié à *S. thermocarboxydus* qui est une bactérie thermophile.

Quatre isolats (**SS8**, **SC11**, **SC12** et **SC13**) forment le cinquième groupe phylogénétique affilié à *S. caelestis* qui fait partie du sous groupe de *S. cyaneus* dans la

classification de **Williams *et al.*, (1989)**. Les isolats (**EL2, SS2 et ES3**) forment des clusters indépendants des autres *Streptomyces*.

93,33 % des isolats appartiennent au genre *Streptomyces*, **4,44 %** au genre *Nocardia* et **2,22 %** au genre *Actinomadura*. Ces résultats confirment l'abondance des *Streptomyces* dans les écosystèmes telluriques par rapport aux autres genres d'actinomycètes.

La présence d'*Actinomadura* et de *Nocardia* dans les isolats est en étroite corrélation avec la technique utilisée (**Larpen et Larpen-Gourgaud (1990)**). Quant à l'absence des autres genres des isolats obtenus peut être expliquée soit par l'absence de ses genres dans les écosystèmes étudiés ou à cause des techniques d'isolement utilisées. Il a été rapporté que seulement 0,001-15 % de la population microbienne présente dans les échantillons environnementaux est cultivable (**Amann *et al.*, 1995**). Généralement, les spores des actinomycètes sont facilement cultivables à partir des échantillons environnementaux, cependant, la sélectivité due aux milieux de culture utilisés pour l'isolement peut affecter leur croissance (**Goodfellow et Simpson, 1987**). La caractérisation d'un organisme en terme de phylotype ne nécessite qu'une séquence génétique et non une cellule fonctionnelle. Par conséquent, les gènes ou fragments de gènes codant pour l'ARNr 16S peuvent être sélectivement amplifiés par PCR à partir de mélanges complexes d'ADN obtenus directement d'échantillons environnementaux. Cette méthode permet alors de s'affranchir de l'étape de culture des microorganismes dans un but d'identification de ces derniers.

Les analyses phylogénétiques sont basées sur la comparaison des séquences avec celles disponibles dans des banques de données internationales. L'arbre phylogénétique finalement obtenu représente les relations phylogénétiques entre les séquences nouvellement obtenues et des séquences de référence. En théorie, les banques de clones représenteraient l'ensemble des molécules amplifiées par PCR, et fourniraient par conséquent une image instantanée de la diversité microbienne de l'échantillon environnemental. Cette technologie est a priori applicable à n'importe quel environnement et peut permettre la détection de microorganismes inaccessibles en culture.

L'essor des techniques moléculaires, principalement basées sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S, a permis la mise en évidence d'une grande diversité phylogénétique dans l'écosystème. Toutefois, cette image de la diversité ne reflète pas la diversité des phénotypes. En effet, ces séquences ne permettent pas toujours d'inférer un

fonctionnement métabolique et donc un rôle écologique aux microorganismes détectés en particulier lorsqu'ils appartiennent à des lignées qui ne sont représentées par aucun membre cultivé. Les techniques de culture classiques, impliquant une sélection des microorganismes cultivés, fournissent une image restreinte de la diversité microbienne d'un écosystème. Cependant, certaines études décrivent l'isolement de microorganismes nouveaux à partir d'échantillons environnementaux dont l'inventaire moléculaire n'en avait pas permis la détection (Alain *et al.*, 2004 ; Gonzalez-Toril *et al.*, 2003). Il apparaît alors clairement qu'aucune des deux approches, culturelle ou moléculaire, ne permettra seule d'élucider les questions d'écologie microbienne, concernant par exemple la biodiversité, le fonctionnement et la dynamique des communautés microbiennes (Leadbetter, 2003).

La méthode utilisée pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des 45 souches actinomycétales isolées est une méthode de diffusion en milieu gélosé (le milieu **Mueller-hinton** pour les bactéries et les milieux **YMA** et **Casitone** pour les tests antifongiques) (Figures 22a et 22b). Il en ressort des résultats obtenus que sur les 45 souches d'actinomycètes, seules 17 souches (37,78 %) sont actives sur au moins une des bactéries-tests étudiées (tableau 15). Les souches **SS2** et **SS4** isolées du sol de sebkha et la souche **SC10** isolée du sol de Constantine sont actives contre toutes les bactéries testées. Seule la souche **EC5** présente une activité uniquement vis à vis de *Staphylococcus aureus* Mu 50 (Figures 22a) (Hôpital Juntendo, Tokyo, Japon) et la souche **EL2** contre *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Streptococcus faecalis* ATCC 19433, **EC3** agit sur toutes les bactéries à coloration de Gram positive et **SS6** est la seule actinomycète qui inhibe uniquement *Proteus vulgaris* ATCC 13315 (tableau 15).

Parmi les souches actinomycétales possédant une activité antibactérienne, seules deux souches (**SS2** et **EL3**) présentent une activité vis à vis des champignons testés (figure 22b et tableau 16). La souche **SS2** inhibe tous les champignons, quant à la souche **EL3**, elle n'agit pas sur *Aspergillus fumigatus* UMIP 1082.74 et *Fusarium oxysporum* UMIP 625.72 (tableau 16).

Dans des études antérieures, il a été démontré que le taux d'isolement d'actinomycètes productrices d'antibiotiques est supérieure à 40 % (Lemriss *et al.*, 2003) et dans d'autres moins de 10 % (Jiang et XU, 1996). Dans cette étude, le taux d'isolement des actinomycètes à activité antibactérienne était de 37,78 % (tableau 17) tandis que celui des actinomycètes à activité antifongique était de 4,44 % (Tableau 18). L'activité antibactérienne la plus intense est obtenu avec le milieu de Bennett (Tableau

17 et 18) ce qui confirme les résultats obtenus par **Kitouni *et al.*, (2005)** et **Khattabi *et al.* (2002)**.

Identification morphologique, physiologique,
biochimique et moléculaire des souches
représentatives

TABLEAU N° 19 : Caractères cultureux de la souche ES4

Milieux de cultures	Croissance	Sporulation	Mycélium du substrat	Mycélium aérien Masse sporale
ISP2	abondante	Abondante	Brun-vert amande	Gris clair
ISP3	faible	faible	Sans couleur	Blanc-gris beige
ISP4	faible	faible	Sans couleur	Gris
ISP5	abondante	abondante	Gris-blanc	Gris clair
Amidon-caséine	abondante	abondante	Gris foncé-noir	Gris clair
Hickey et Tresner	abondante	abondante	Brun-vert amande	Gris foncé
Glucose-extrait de levure-peptone	abondante	abondante	Gris	Gris clair-blanc
Sporulation agar	abondante	abondante	Gris	Gris
Glucose-asparagine	abondante	abondante	Beige-gris clair	Gris clair
Czapeck- Dox agar	faible	faible	Sans couleur	gris clair
Benett	modérée	faible	Gris clair	rose

TABLEAU N° 20 : Caractères cultureux de la souche SS4

Milieux de cultures	Croissance	Sporulation	Mycélium du substrat	Mycélium aérien Masse sporale
ISP2	abondante	abondante	Brun-Jaune	Gris- vert amande
ISP3	faible	abondante	Jaune	Blanc cassé-jaune
ISP4	faible	modérée	Sans couleur	absent blanc cassé
ISP5	abondante	modérée	Brun-Jaune	beige
Amidon-caséine	abondante	abondante	brun	beige
Hickey et Tresner	modérée	modérée	brun	brun-jaune
Glucose-extrait de levure-peptone	abondante	abondante	brun	brun
Sporulation agar	abondante	abondante	brun-gris	gris-beige
Glucose-asparagine	modérée	faible	brun clair	beige
Czapeck- Dox agar	faible	faible	sans couleur	beige

TABLEAU N° 21 : Caractères cultureux de la souche SS5

Milieux de cultures	Croissance	sporulation	Mycélium du substrat	Mycélium aérien Masse sporale
ISP2	abondante	Faible	Beige	Beige
ISP3	faible	néant	Sans couleur	absent
ISP4	faible	faible	Sans couleur	absent, blanche
ISP5	faible	faible	Blanc crème	blanche
Amidon-caséine	abondante	abondante	Blanc beige	Blanc beige
Hickey et Tresner	modérée	modérée	beige	Beige-blanc
Glucose-extrait de levure-peptone	modérée	modérée	beige	Beige-blanc
Sporulation agar	abondante	abondante	Beige jaunâtre	Beige-blanc
Glucose-asparagine	faible	faible	beige	beige
Czapeck- Dox agar	faible	néant	sans couleur	absent

1- Résultats

1-1 Etude morphologique

1-1-1 Caractères culturels

Après ensemencement sur les différents milieux de culture gélosés, les colonies des souches **ES4**, **SS4** et **SS5** apparaissent au bout de deux jours d'incubation à 30° C et se développent sans diffusion dans aucun des milieux gélosés utilisés.

Les caractères culturels des trois isolats **ES4**, **SS4** et **SS5** sur les onze milieux de culture gélosés utilisés sont rassemblés dans les **tableaux 19, 20 et 21**. Toutes les souches se développent sur tous les milieux utilisés avec différents degrés de croissance allant d'une croissance faible à une croissance abondante.

Les colonies sont rondes à contours irréguliers, opaques, d'aspect corné et de surface poudreuse. Les colonies adhèrent fermement au milieu de culture où elles forment une légère dépression et sont difficiles à mettre en suspension.

Sur le milieu ISP2 la souche **ES4** forme des colonies typiques des bactéries appartenant à la classe des *Actinobacteria*, et l'ordre des *Actinomycetales* de 2 à 5 mm de diamètre, de contour irrégulier. La surface des colonies est poudreuse, de couleur grise au centre et blanche vers l'extérieur. Il n'y a pas production de pigments diffusibles. L'observation microscopique des colonies au grossissement x10 révèle la présence de filaments très fins et très ramifiés.

La souche **ES4** se développe, sur les différents milieux de culture. La texture des colonies rappelle celle de la peau de chamois de couleur grise, le bord est frangé. L'envers des colonies est gris à brun. Sur le milieu de Bennett la souche a développée après maturation une masse sporale de couleur rose (**Figure 23a et 23b**).

La souche **SS4**, sur le milieu ISP2, forme des colonies de 2 à 3 mm de diamètre d'aspect pâteux et de couleur jaune. Il faut noter la production d'un pigment jaune diffusible. L'observation microscopique à l'objectif x10 révèle un contour irrégulier, avec des filaments très courts et peut ramifiés ou absence de ramification.

Les colonies de la souche **SS4** sur les différents milieux de culture ressemblent à du cuir avec une surface froissée et poudreuse. Elles sont aplaties. Elles produisent un pigment dans les temps gris, brun à jaune que l'on peut voir aussi bien à la surface des colonies qu'à l'envers de celles-ci. Après maturation, la masse sporale est de couleur variable en fonction du milieu de culture. Elle est de gris à jaune passant par le vert amande et le brun. Sur les milieux ISP3 et le milieu Czapeck Dox agar le développement du mycélium aérien est faible au point d'être inexistant dans le milieu ISP4. Un pigment



Figure 23a : Cultures des isolats ES4 et SS4 sur différents milieux de culture



Figure 23b : Cultures des isolats ES4 et SS4 sur différents milieux de culture



Figure 24a : Cultures de l'isolat SS5 sur le milieu sporulation agar

brun est secrété par la souche dans tous les milieux de culture utilisés (**Figure 23a et 23b**).

La souche **SS5** pousse lentement sur le milieu ISP2, les colonies sont très petites (1 mm de diamètre), leurs couleur est blanche crémeuse, le mycélium du substrat est de couleur blanc nacré. L'observation au microscope à l'aide du grossissement x10 révèle la présence des filaments très enchevêtrés à l'extrémité des colonies. L'isolat ne produit pas de pigment diffusible.

Cette souche pousse très lentement, surtout à l'isolement, les **photos** de la **figure 24a et 24b** montrent l'importance du développement que l'on peut atteindre d'une culture après 21 jours d'incubation à 30° C. Elle se développe sous forme de colonies opaques bosselées compactées d'aspect corné très sèche. Sur le milieu sporulation agar elle présente des sillons radiaires. Le mycélium de substrat est abondant, bien développé de couleur beige à jaune claire, le pigment est non diffusible. Le mycélium aérien est absent dans les milieux ISP3, ISP4 et le milieu de Czapeck-Dox agar. Après maturation, la masse sporale est de couleur crème. Elle se cultive bien sur les milieux ISP2, Amidon caséine et le milieu sporulation agar.

La croissance la plus abondante, pour les trois souches étudiées (**ES4, SS4 et SS5**), a été observée sur les milieux Amidon-Caséine et Sporulation Agar. Elle est moyenne pour le milieu ISP2. Le milieu ISP4 est le milieu le moins favorable pour la croissance des souches actinomycétales étudiées.

1-1-2 Observation au microscope optique

Les hyphes du mycélium végétatif de la souche **ES4** sont fins non fragmentés, non sporulés et peu ramifiés (**Photo a de la figure 25**). Ils se développent en surface et pénètrent dans la gélose, puis donnent naissance à un mycélium aérien, long, fin et très ramifié. Il porte de longues chaînes de spores cylindriques plus de 15 spores par chaîne (**Photos b de la figure 25**) donnant un aspect poudreux à la surface des colonies. Les chaînes de spores sont droites de type rectiflexible. Les spores isolées ne présentent aucune mobilité.

L'observation au microscope optique du mycélium végétatif de la souche **SS4** montre des filaments non fragmentés, non sporulés et très ramifiés (**Photo c de la figure 25**). Le mycélium aérien est absent. Dans le cas où il est présent, il est peu développé. Il porte de longues chaînes de spores. Les spores isolées ne présentent aucune mobilité. L'observation microscopique au grossissement x 100 du mycélium de substrat de la souche **SS5** met en évidence de gros hyphes très ramifiés, très enchevêtrés, non septés

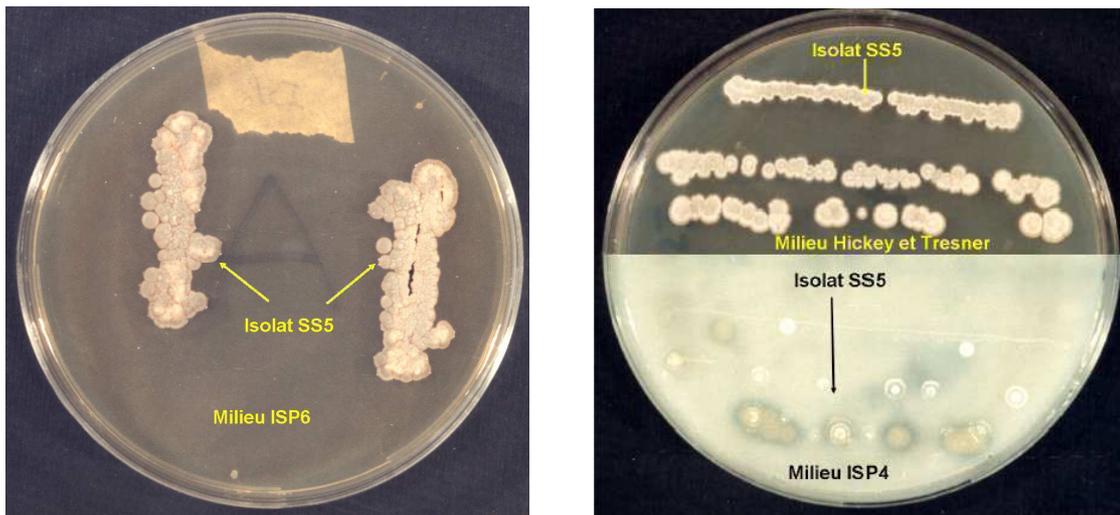


Figure 24b : Cultures de l'isolat SS5 sur différents milieux de culture

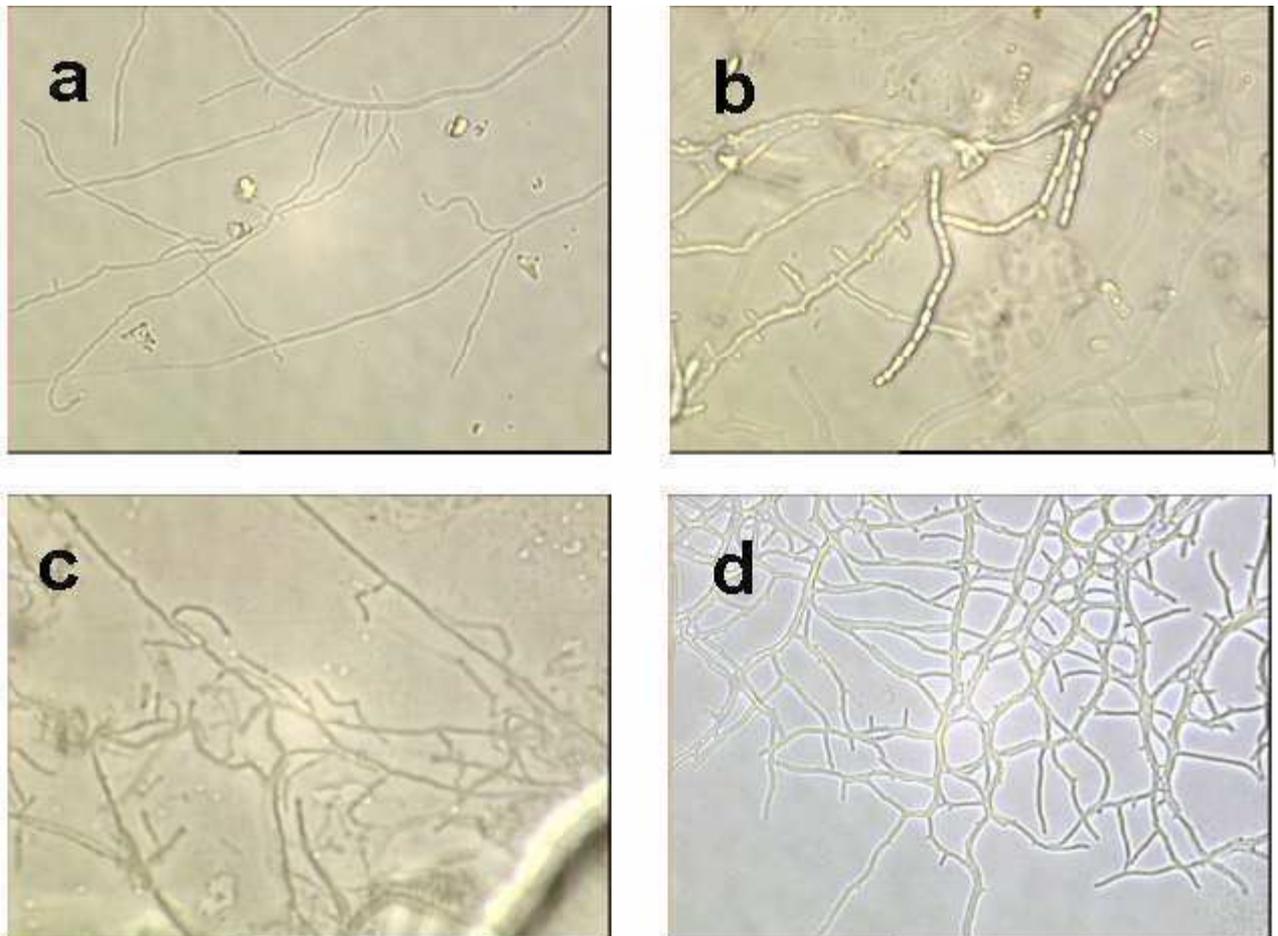


Figure 25 : Les souches ES4, SS4 et SS5 en microscope optique (microscope modèle orthoplan type Zeiss) grandissement x 100 (technique des lamelles). **a** : mycélium du substrat de la souche ES4 ; **b** : mycélium aérien avec les chaînes de spores de la souche ES4 ; **c** : mycélium du substrat de la souche SS4 et **d** : mycélium du substrat des souches SS5.

TABLEAU N° 22 : Etude Chimiotaxonomique des souches **ES4**, **SS4** et **SS5**

Caractéristiques	Souches		
	ES4	SS4	SS5
Méso-DAP	-	-	+
LL-DAP	+	+	-
Glycine	+	+	-
Alanine	-	-	-
Lysine	-	-	-
Acide aspartique	-	-	-
Acide glutamique	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Galactose	+	+	-
Glucose	+	+	+
Madurose	-	-	+

(Photos d de la figure 25) avec absence totale de structures mobiles ou de spores. Le mycélium aérien porte de courtes chaînes de spores formant des crochets. Toutes les souches ne présentent pas de sporanges ni de synnémas ni de sclérotés.

1-2 Etude chimiotaxonomique

Les résultats obtenus après extraction et séparation des acides aminés et des sucres des hydrolysats cellulaires par la technique de chromatographie ascendante sur plaque de cellulose en présence des témoins sont mentionnés dans le **tableau 22**.

1-3 Etude physiologique et biochimique

Les résultats des différents caractères physiologiques et biochimiques des isolats **ES4**, **SS4** et **SS5** sont réunis dans le **tableau 23**. Ces résultats nous fournissent des éléments essentiels pour la classification de nos souches au niveau de l'espèce. Les souches **ES4** et **SS4** cultivées sur le milieu ISP9 se développent sur les différentes sources de carbone étudiées, à l'exception, du sorbose et du citrate. Le dulcitol, le fructose, le lévulose, le lactose, le rhamnose, le mélibiose et le raffinose ne sont utilisés que par la souche **SS4**. Seule la souche **ES4** dégrade le saccharose mais pas l'inositol. La souche **SS5** n'utilise comme source de carbone et de croissance que le glucose, le galactose et l'inositol.

Les souches **ES4** et **SS4** produisent des pigments diffusibles brun et jaune respectivement sur le milieu ISP6 mais pas sur le milieu ISP7. Les trois souches montrent un métabolisme protéique important, elles hydrolysent la caséine et liquéfient la gélatine, elles coagulent le lait écrémé. Elles n'hydrolysent pas l'urée à l'exception de la souche **ES4**, elles ne produisent pas d'indole. Elles réduisent les nitrates en nitrites à l'exception de la souche **SS4**. Elles produisent l'acétylméthylcarbinol (AMC). Seule la souche **SS5** produit des acides forts après fermentation du glucose. L' H_2S n'est produit que par la souche **ES4**.

La souche **SS4** tolère 8% de NaCl, la souche **ES4** tolère 7% de NaCl alors que l'isolat **SS5** est inhibé par une concentration de 6%. Les trois isolats sont inhibés par un pH égal à 3,3. Les isolats **ES4** et **SS5** montrent une croissance à un pH de 12,3.

Les souches **ES4**, **SS4** et **SS5** présentent une bonne croissance entre 20° C et 37° C, avec un optimum entre 25° C et 30° C, ce qui correspond à l'intervalle de température cité dans la bibliographie. La souche **SS5** ne pousse pas à 5° C ni à 45° C. Les souches **ES4** et **SS4** se développent de 5° C à 55° C (**Tableau 24**).

TABLEAU N° 23 : Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches (ES4, SS4 et SS5)

Caractéristiques	Souches		
	ES4	SS4	SS5
Source de carbone			
Témoin négatif	-	-	-
Inositol	-	+	+
Amidon	+	+	-
Dulcitol	-	+	-
Galactose	+	+	+
Saccharose	+	-	-
Fructose	-	+	-
Glycérol	+	+	-
Maltose	+	+	-
Mannitol	+	+	-
Mannose	+	+	-
Lévulose	-	+	-
Lactose	-	+	-
Rhamnose	-	+	-
Mélibiose	-	+	-
Raffinose	-	+	-
Dextrine	+	+	-
Glucose	+	+	+
Sorbose	-	-	-
Xylose	+	+	-
Citrate	-	-	-
Hydrolyse de la gélatine	+	+	+
Hydrolyse de la caséine	+	+	+
Coagulation du lait écrémé :	+	+	+
Peptonisation du lait écrémé	-	-	+
Réduction des nitrates	+	-	+
Dégradation de l'urée	+	-	-
Production de l'indole	-	-	-
Production d'H₂S	+	-	-
Production de l'hydrogène	-	-	-
Réaction de Voges-Proskauer	+	+	+
Réaction avec le rouge de méthyle	-	-	+
Production de pigments mélanoïde sur le milieu ISP6	+	+	-
Production de pigments mélanoïde sur le milieu ISP7	-	-	-
Croissance en présence du NaCl : 0 %	+	+	+
3 %	+	+	+
4 %	+	+	+
5 %	+	+	+
6 %	+	+	-
7 %	+	+	-
8 %	-	+	-
9 %	-	-	-
10 %	-	-	-
Croissance à pH : 3,3	-	-	-
5,3	+	+	+
9,3	+	+	+
12,3	+	-	+

TABLEAU N° 24 : Croissance des souches actinomycétales à différentes températures :

Températures de croissance	Les souches actinomycétales		
	ES4	SS4	SS5
5° C	+	+	-
20° C	+	++	+
25° C	++	+++	++
27° C	++	+++	+++
30° C	+++	+++	+++
37° C	+	++	++
45° C	+	+	-
55° C	+	+	-

- : pas de croissance ou croissance faible, + : Croissance modérée, ++ : croissance abondante, +++ : croissance très abondante.

TABLEAU N°25 : Les degrés de similarité entre les séquences de l'ARNr 16S des souches **ES4, SS4, SS5** et des espèces représentatives des genres *Streptomyces* et *Actinomadura*.

Espèces	Pourcentage de similitude avec les souches		
	ES4	SS4	SS5
<i>S. bikiniensis</i> DSM40581	98 %	-	-
<i>S. viridobrunneus</i> LMG 20317	99 %	-	-
<i>S. tanashiensis</i> LMG 20274	99 %	-	-
<i>S. biverticillatus</i> LMG 20433	98 %	-	-
<i>S. olivoreticuli subsp. olivoreticuli</i> LMG 20050	98 %	-	-
<i>S. laurentii</i> LMG 19959	98 %	-	-
<i>S. parvisporogenes</i> LMG 20072	97 %	-	-
<i>S. syringium</i> LMG 20320	97 %	-	-
<i>S. caviscabies</i> ATCC51928	-	99 %	-
<i>S. setonii</i>	-	99 %	-
<i>S. mediolani</i> LMG 20093	-	99 %	-
<i>S. griseus</i>	-	99 %	-
<i>S. flavogriseus</i> CBS SS5.34T	-	99 %	-
<i>Actinomadura meyerii</i> A288	-	-	98 %
<i>Actinomadura napiensis</i> B60 ^T	-	-	97 %
<i>Actinomadura madurae</i> IFO14623	-	-	97 %
<i>Actinomadura hallensis</i> H647-1	-	-	97 %
<i>Actinomadura formosensis</i> DSM 43997 ^T	-	-	97 %
<i>Actinomadura nitritigenes</i>	-	-	97 %
<i>Actinomadura citrea</i> DSM 43461 ^T	-	-	97 %
<i>Actinomadura viridis</i> DSM 43175 ^T	-	-	97 %
<i>Actinomadura mexicana</i>	-	-	97 %
<i>Actinomadura latina</i>	-	-	97 %
<i>Spirillospora albida</i> IFO12248	-	-	97 %
<i>Actinomadura chibensis</i>	-	-	97 %
<i>Actinomadura fulvescens</i> DSM 43923 ^T	-	-	97 %
<i>Actinomadura atramentaria</i> DSM 43919 ^T	-	-	97 %
<i>Actinomadura rudentiformis</i> HMC1	-	-	97 %
<i>A. kijaniata</i> DSM 43764 ^T	-	-	97 %
<i>Actinomadura echinospora</i> DSM 43163T	-	-	97 %
<i>Actinomadura glucoflavus</i>	-	-	97 %
<i>Actinomadura namibiensis</i> DSM 44197T	-	-	97 %
<i>Actinocorallia herbida</i> IFO 15485	-	-	97 %
<i>Actinomadura hibisca</i> DSM 44148T	-	-	97 %
<i>Actinomadura catellatospora</i>	-	-	97 %

1-4 Analyse phylogénétique

Les souches **ES4**, **SS4** et **SS5** ont fait l'objet de l'extraction et le séquençage de leurs 16S rDNA afin de déterminer leurs emplacements phylogénétique parmi les espèces représentatives des genres *Streptomyces* et *Actinomadura*.

Les similitudes des séquences des 16S rDNA des souches étudiées avec les espèces représentatives des deux genres sont mentionnées dans le **tableau 25**.

Il en ressort que la souche **ES4** partage un pourcentage d'identité égale à 98 % avec les espèces *S. viridobrunneus*, *S. tanashiensis*, *S. bikiniensis*, *S. biverticillatus*, *S. olivoreticuli* et *S. laurentii*. Les espèces *S. caviescabies*, *S. setonii*, *S. mediolani*, *S. griseus* et *S. flavogriseus* montrent une forte similarité avec la souche **SS4** (99 %). Alors que l'espèce *Actimadura meyerii* présente le plus grand pourcentage de parenté avec l'isolat **SS5** (98 %).

Un arbre phylogénétique non enraciné a été construit par la méthode des distances Neighbor-Joining (NJ) (**Saitou et Nei, 1987**) à l'aide du logiciel Mega version 3.1 (**Kumar et al., 2004**) (**figures 26**) pour déterminer l'emplacement phylogénétique des isolats ES4 et SS4 en utilisant la matrice de distances représentée dans le **tableau 26**.

L'isolat **ES4** semble être apparenté à *S. viridobrunneus* car il occupe la même ligne phylogénétique que cette espèce avec une valeur de bootstrap faible (79 %). La distance séparant les deux espèces est égale à **0,005** (**Tableau 26**).

L'isolats **SS4** est apparenté, d'après l'arbre phylogénétique de la **figure 26**, à trois espèces du genre *Streptomyces* (*S. caviescabies*, *S. setonii* et *S. griseus*) avec un bootstrap très faible (57 %). Si on se réfère aux distances représentées dans la matrice des distances représentée dans le **tableau 26**, nous pouvons dire que l'isolat SS4 est plus proche des espèces *S. caviescabies* et, *S. setonii* vu les valeurs des distances qui le sépare de ses deux espèces et qui équivaut 0,001 qu'à l'espèce *S. griseus* (la valeur de la distance est de 0,002) (**Tableau 26**).

Afin de déterminer avec précision la position phylogénétique des isolats ES4 et SS4, un deuxième arbre phylogénétique non enraciné a été construit par la méthode des distances Neighbor-Joining (NJ) (**Saitou et Nei, 1987**) à l'aide du logiciel Mega version 3.1 (**Kumar et al., 2004**) (**Figure 27**). Le deuxième arbre est construit à partir des séquences de la région hypervariable γ du gène 16S rDNA (région discriminante pour les espèces du genre *Streptomyces*) en utilisant la matrice des distances représentée dans le **tableau 27**. Il en ressort de ce dernier que la distance séparant l'isolat ES4 de *S. viridobrunneus* est de 0,034 ; valeur très supérieur aux valeurs des distances qui

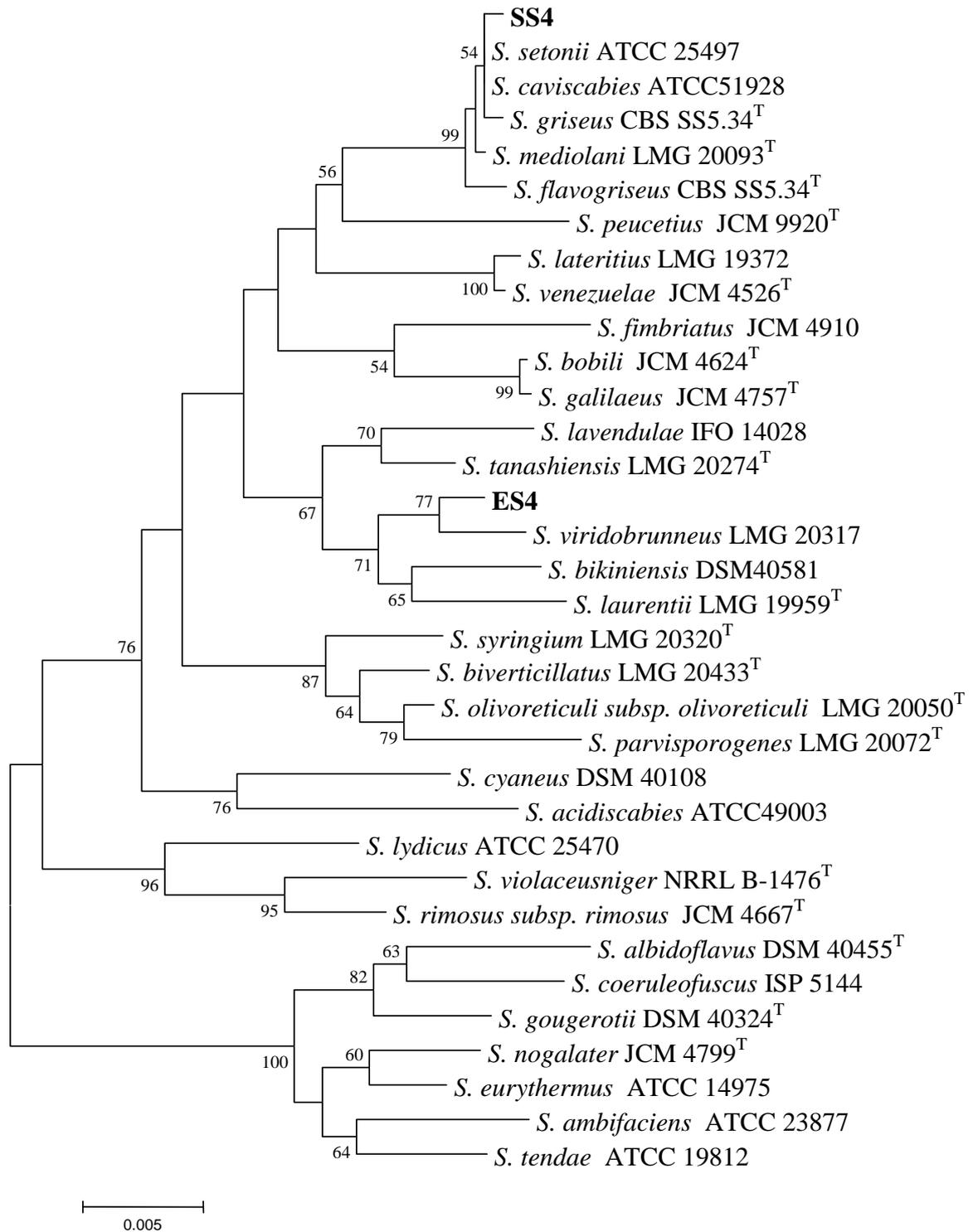


Figure 26 : Arbre selon la méthode des distances (**Neighbor-Joining**) construit d'après l'analyse des séquence d'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 3.1 (**Kumar, Tamura, Nei 2004**) montrant la position phylogénétique des isolats ES4 et SS4 parmi les espèces représentatives du genre *Streptomyces*. La matrice des distances est calculée selon le model Kimura à 2 paramètres (**Kimura, 1980**). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap. 0,005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

TABLEAU N°26 : Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S des bactéries du genre *Streptomyces*

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	ES4														
2	SS4	0.021													
3	<i>S.violaceusniger</i> NRRL B-1476T	0.038	0.037												
4	<i>S.albidoflavus</i> DSM 40455T	0.047	0.050	0.028											
5	<i>S.gougerotii</i> DSM 40324T	0.037	0.042	0.035	0.013										
6	<i>S.coeruleofuscus</i> ISP5144	0.044	0.047	0.033	0.013	0.013									
7	<i>S.nogalater</i> JCM 4799T	0.037	0.042	0.033	0.017	0.013	0.013								
8	<i>S.eurythermus</i> ATCC 14975	0.032	0.042	0.037	0.019	0.016	0.017	0.008							
9	<i>S.ambifaciens</i> ATCC 23877	0.037	0.046	0.037	0.024	0.019	0.021	0.014	0.013						
10	<i>S.tendae</i> ATCC 19812	0.036	0.042	0.038	0.023	0.015	0.017	0.013	0.010	0.013					
11	<i>S.lydicus</i> ATCC 25470	0.032	0.032	0.018	0.035	0.042	0.039	0.037	0.034	0.037	0.039				
12	<i>S.rimosus subsp. rimosus</i> JCM 4667T	0.035	0.035	0.013	0.029	0.033	0.032	0.033	0.037	0.036	0.037	0.018			
13	<i>S.bobili</i> JCM 4624T	0.027	0.017	0.038	0.042	0.037	0.038	0.034	0.035	0.038	0.033	0.033	0.039		
14	<i>S.galilaeus</i> JCM 4757T	0.026	0.017	0.038	0.042	0.037	0.039	0.035	0.036	0.039	0.034	0.033	0.040	0.001	
15	<i>S.fimbriatus</i> JCM 4910	0.024	0.022	0.037	0.040	0.038	0.042	0.033	0.025	0.032	0.028	0.031	0.037	0.013	0.014
16	<i>S.lavendulae</i> IFO 14028	0.018	0.023	0.033	0.044	0.039	0.047	0.039	0.034	0.038	0.037	0.029	0.033	0.027	0.027
17	<i>S.peucetius</i> JCM 9920T	0.023	0.016	0.029	0.046	0.041	0.043	0.040	0.041	0.046	0.042	0.030	0.037	0.019	0.019
18	<i>S.lateritius</i> LMG 19372	0.013	0.017	0.035	0.043	0.037	0.046	0.036	0.037	0.036	0.042	0.033	0.035	0.023	0.023
19	<i>S.venezuelae</i> JCM 4526T	0.013	0.015	0.034	0.044	0.037	0.047	0.037	0.037	0.037	0.042	0.033	0.034	0.023	0.023
20	<i>S.setonii</i> ATCC 25497	0.020	0.001	0.036	0.049	0.041	0.046	0.042	0.042	0.045	0.042	0.031	0.034	0.016	0.017
21	<i>S.caviscabies</i> ATCC 51928	0.020	0.001	0.036	0.049	0.041	0.046	0.042	0.042	0.045	0.042	0.031	0.034	0.016	0.017
22	<i>S.cyaneus</i> DSM 40108	0.031	0.027	0.035	0.033	0.037	0.033	0.035	0.039	0.038	0.035	0.036	0.035	0.017	0.016
23	<i>S.acidiscabies</i> ATCC 49003	0.034	0.032	0.034	0.038	0.039	0.037	0.038	0.039	0.042	0.037	0.036	0.032	0.024	0.025
24	<i>S.bikiniensis</i> DSM 40581	0.009	0.024	0.041	0.052	0.042	0.047	0.039	0.035	0.041	0.037	0.035	0.038	0.027	0.028
25	<i>S.viridobrunneus</i> LMG 20317	0.005	0.025	0.040	0.043	0.037	0.043	0.032	0.028	0.033	0.035	0.033	0.038	0.026	0.025
26	<i>S.tanashiensis</i> LMG 20274T	0.009	0.020	0.034	0.047	0.042	0.049	0.039	0.034	0.040	0.038	0.030	0.036	0.025	0.025
27	<i>S.biverticillatus</i> LMG 20433T	0.013	0.025	0.035	0.042	0.042	0.042	0.043	0.036	0.042	0.040	0.027	0.030	0.032	0.031
28	<i>S.olivoreticuli subsp. olivoreticuli</i> LMG 20050T	0.014	0.025	0.033	0.041	0.040	0.039	0.042	0.034	0.040	0.039	0.028	0.029	0.031	0.030
29	<i>S.laurentii</i> LMG 19959T	0.015	0.026	0.042	0.042	0.042	0.040	0.042	0.036	0.042	0.038	0.033	0.037	0.026	0.027
30	<i>S.mediolani</i> LMG 20093T	0.020	0.002	0.035	0.049	0.041	0.046	0.041	0.041	0.044	0.041	0.030	0.033	0.017	0.017
31	<i>S.flavogriseus</i> CBS 101.34T	0.023	0.003	0.035	0.052	0.043	0.048	0.044	0.044	0.047	0.044	0.032	0.037	0.018	0.019
32	<i>S.griseus</i> CBS SS5.34T	0.021	0.002	0.037	0.050	0.042	0.047	0.042	0.042	0.046	0.042	0.030	0.035	0.017	0.017
33	<i>S.parvisporogenes</i> LMG 20072T	0.023	0.033	0.026	0.035	0.034	0.033	0.037	0.033	0.036	0.035	0.025	0.024	0.038	0.037
34	<i>S.syringium</i> LMG 20320T	0.020	0.022	0.034	0.042	0.041	0.040	0.042	0.041	0.044	0.044	0.029	0.028	0.030	0.029

TABLEAU N°26 (suite)

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
	0.023																		
	0.028	0.023																	
	0.024	0.022	0.019																
	0.024	0.021	0.018	0.002															
	0.021	0.022	0.015	0.016	0.014														
	0.021	0.022	0.015	0.016	0.014	0.000													
	0.018	0.033	0.030	0.029	0.029	0.026	0.026												
	0.027	0.036	0.031	0.033	0.033	0.031	0.031	0.020											
	0.026	0.021	0.022	0.017	0.018	0.023	0.023	0.034	0.035										
	0.020	0.019	0.027	0.013	0.013	0.025	0.025	0.029	0.034	0.012									
	0.022	0.009	0.017	0.014	0.013	0.020	0.020	0.033	0.033	0.012	0.010								
	0.027	0.021	0.026	0.025	0.025	0.024	0.024	0.026	0.030	0.023	0.017	0.021							
	0.026	0.025	0.026	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.028	0.022	0.018	0.022	0.005						
	0.025	0.023	0.025	0.021	0.022	0.025	0.025	0.028	0.028	0.012	0.014	0.014	0.020	0.019					
	0.021	0.021	0.014	0.015	0.013	0.001	0.001	0.025	0.030	0.022	0.024	0.019	0.023	0.024	0.025				
	0.024	0.025	0.014	0.018	0.017	0.002	0.002	0.029	0.032	0.025	0.027	0.022	0.025	0.027	0.028	0.003			
	0.022	0.021	0.016	0.017	0.015	0.001	0.001	0.027	0.032	0.024	0.025	0.020	0.025	0.025	0.026	0.002	0.003		
	0.034	0.033	0.032	0.033	0.032	0.032	0.032	0.029	0.028	0.031	0.027	0.031	0.013	0.009	0.028	0.031	0.033	0.033	
	0.031	0.026	0.025	0.023	0.021	0.021	0.021	0.025	0.027	0.028	0.024	0.027	0.008	0.009	0.025	0.021	0.024	0.021	0.018

séparent l'isolat ES4 de *S. oliverticuli* et *S. biverticillatus*, ce qui explique l'emplacement de l'isolat ES4 sur une branche phylogénétique indépendante (**Figure 27**).

La **figure 27** montre que l'isolat SS4 a conservé plus ou moins son emplacement phylogénétique avec les espèces *S. caviescabies*, *S. setonii* et *S. griseus* ce qui est confirmé par les valeurs de distances égales à zéro (0,000) (**Tableau 27**).

Pour élucider la position phylogénétique de l'isolat SS5, un arbre phylogénétique enraciné a été construit par la méthode des distances Neighbor-Joining (NJ) (**Saitou et Nei, 1987**) à l'aide du logiciel Mega version 3.1 (**Kumar et al., 2004**) (**figures 28**), en utilisant l'espèce type *Actinocorrallia herbida* IFO 15485 comme outgroupe. L'arbre en question est construit en se basant sur la matrice des distances représentée dans le **tableau 28**.

L'isolat **SS5** occupe la même branche phylogénétique qu'*Actinomadura meyerii* elle semble être l'espèce la plus proche de notre isolat ce qui est bien corroboré par la valeur de la distance 0,017 (**tableau 28**), la plus faible distance séparant l'isolat SS5 des autres espèces du genre *Actinomadura*.

2- Discussion

Le nombre d'espèces appartenant au genre *Streptomyces* est en augmentation continue. En 1997, 464 espèces validées et 45 sous-espèces ont été recensées (**Hain et al., 1997**), en septembre 2002 il y avait plus de 650 espèces conservées dans la collection allemande de micro-organismes (**DSMZ**). Ainsi, le genre *Streptomyces* est le plus grand genre de l'ordre des *Actinomycetales* dans la classe des *Actinobacteria* (**Stackebrandt et al., 1997**). Les genres *Streptoverticillium* et *Kitasatospora* ont été inclus dans le genre *Streptomyces* (**Witt et Stackebrandt, 1990, Wellington et al., 1992**), bien que la position taxonomique de *Kitasatospora* n'est pas bien claire (**Zhang et al., 1997**).

La classification des bactéries du genre *Streptomyces* était à l'origine basée sur les caractères morphologiques et biochimiques, plus tard sur les tests physiologiques (**Kutzner, 1986 ; Williams et al., 1983, Goodfellow et al., 1987, Kämpfer et al., 1991 ; Goodfellow et al., 1992**). Les méthodes sérologiques (**Ridell et al., 1986**), la lysotypie (**Korn-Wendish et Schneider, 1992**) et le profil protéique (**Ochi, 1995 ; Taguchi et al., 1997**) ont été également utilisés dans leur classification. L'application des méthodes génétiques, telles que l'hybridation DNA-DNA (**Labeda, 1992 ; Kim et al., 1999**) et l'analyse des séquences du gène de l'ADNr 16S (**Gladek et al., 1985 ; Stackebrandt et al., 1992 ; Kim et al., 1996, Takeuchi et al., 1996 ; Hain et al., 1997 ; Kataoka et al.,**

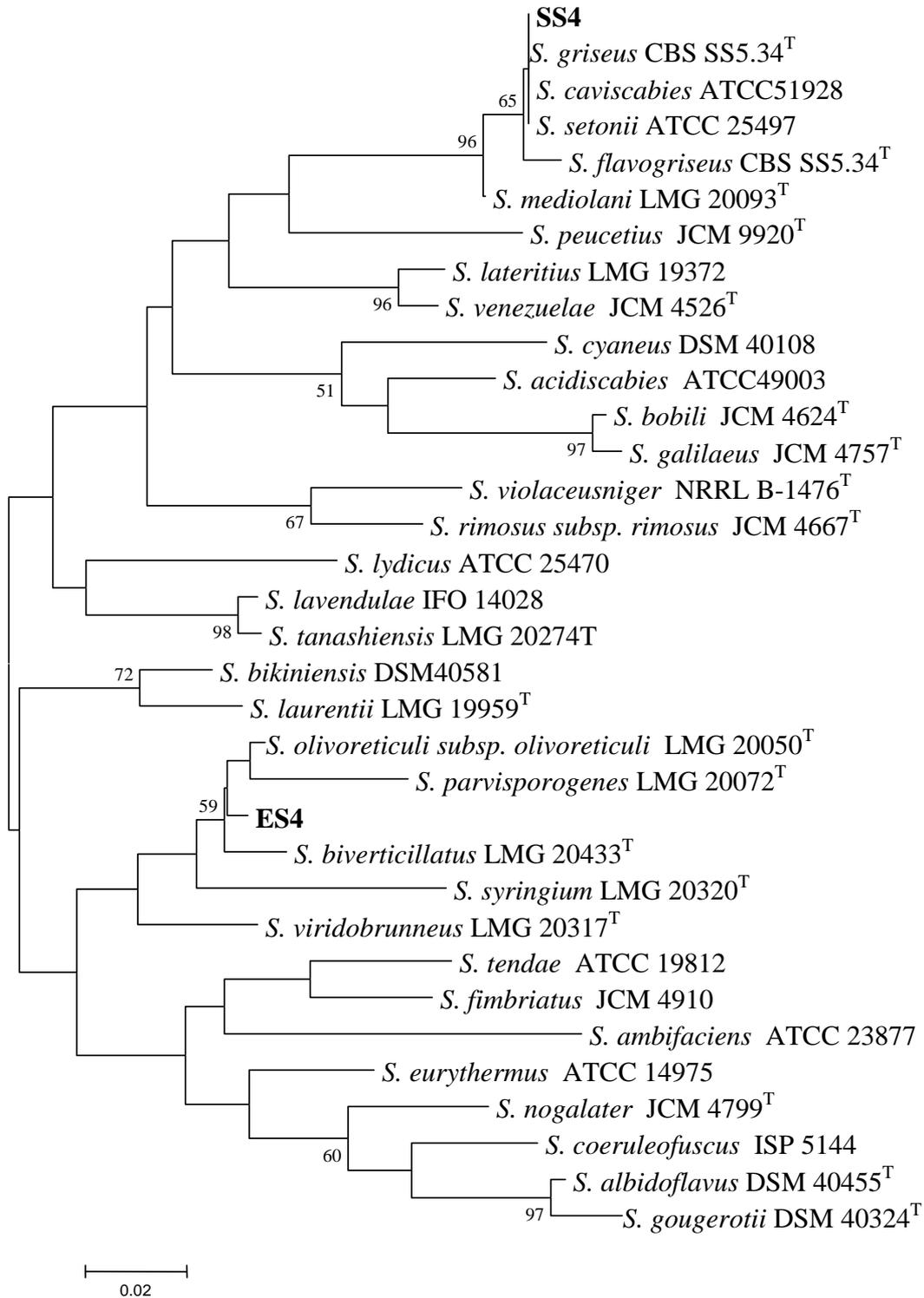


Figure 27: Arbre selon la méthode des distances (**Neighbor-Joining**) construit d'après l'analyse des séquence de la région hypervariable γ de l'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 3.1 (**Kumar, Tamura, Nei 2004**) montrant la position phylogénétique de isolat ES4 parmi les espèces représentatives du genre *Streptomyces*. La matrice des distances est calculée selon le model Kimura à 2 paramètres (**Kimura, 1980**). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstraps. 0,02 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

TABLEAU N°27 : Matrice des distances calculées à partir des séquences de 120 pb (région hypervariable) des bactéries du genre *Streptomyces*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 ES4														
2 SS4	0.167													
3 <i>S. olivoreticuli</i> subsp. <i>olivoreticuli</i> LMG 20050 ^T	0.008	0.167												
4 <i>S. biverticillatus</i> LMG 20433 ^T	0.017	0.178	0.026											
5 <i>S. viridobrunneus</i> LMG20317 ^T	0.034	0.210	0.044	0.053										
6 <i>S. parvisporogenes</i> LMG20072 ^T	0.043	0.188	0.034	0.043	0.080									
7 <i>S. violaceusniger</i> NRRLB-14	0.157	0.137	0.147	0.147	0.200	0.127								
8 <i>S. albidoflavus</i> DSM40455 ^T	0.168	0.178	0.157	0.178	0.147	0.157	0.128							
9 <i>S. gougerotii</i> DSM40324 ^T	0.167	0.200	0.157	0.178	0.147	0.157	0.148	0.017						
10 <i>S. coeruleofuscus</i> ISP5144	0.157	0.167	0.147	0.168	0.137	0.147	0.137	0.061	0.061					
11 <i>S. nogalater</i> JCM 4799 ^T	0.147	0.168	0.137	0.157	0.107	0.157	0.137	0.098	0.098	0.043				
12 <i>S. eurythermus</i> ATCC 14975	0.089	0.199	0.079	0.099	0.070	0.118	0.189	0.117	0.117	0.079	0.061			
13 <i>S. ambifaciens</i> ATCC 23877	0.138	0.223	0.138	0.159	0.118	0.139	0.233	0.168	0.168	0.147	0.127	0.107		
14 <i>S. tendae</i> ATCC 19812	0.127	0.178	0.127	0.137	0.108	0.127	0.189	0.158	0.158	0.137	0.117	0.070	0.089	
15 <i>S. lydicus</i> ATCC25470	0.108	0.147	0.117	0.108	0.147	0.137	0.117	0.189	0.200	0.189	0.189	0.189	0.210	0.189
16 <i>S. rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> JCM 4667 ^T	0.147	0.127	0.137	0.157	0.189	0.137	0.052	0.117	0.127	0.117	0.117	0.167	0.210	0.167
17 <i>S. bobili</i> JCM 4624 ^T	0.210	0.089	0.210	0.222	0.189	0.233	0.157	0.157	0.178	0.147	0.167	0.189	0.211	0.147
18 <i>S. galilaeus</i> JCM 4757 ^T	0.199	0.098	0.199	0.210	0.178	0.222	0.157	0.157	0.178	0.157	0.178	0.199	0.222	0.158
19 <i>S. fimbriatus</i> JCM 4910	0.117	0.127	0.117	0.127	0.098	0.147	0.189	0.148	0.168	0.158	0.147	0.079	0.138	0.052
20 <i>S. lavendulae</i> IFO14028	0.079	0.147	0.088	0.088	0.117	0.127	0.107	0.178	0.200	0.210	0.199	0.147	0.210	0.147
21 <i>S. peucetius</i> JCM 9920 ^T	0.178	0.098	0.168	0.168	0.221	0.168	0.070	0.157	0.178	0.178	0.189	0.210	0.256	0.210
22 <i>S. lateritius</i> LMG19372	0.127	0.098	0.127	0.147	0.147	0.147	0.147	0.147	0.147	0.167	0.157	0.178	0.147	0.178
23 <i>S. venezuelae</i> JCM 4526 ^T	0.117	0.079	0.117	0.137	0.157	0.137	0.137	0.157	0.157	0.178	0.167	0.189	0.168	0.178
24 <i>S. setonii</i> ATCC 25497	0.167	0.000	0.167	0.178	0.210	0.188	0.137	0.178	0.200	0.167	0.168	0.199	0.223	0.178
25 <i>S. caviscabies</i> ATCC51928	0.167	0.000	0.167	0.178	0.210	0.188	0.137	0.178	0.200	0.167	0.168	0.199	0.223	0.178
26 <i>S. cyaneus</i> DSM40108	0.178	0.138	0.178	0.188	0.137	0.167	0.137	0.117	0.137	0.117	0.117	0.178	0.168	0.128
27 <i>S. acidiscabies</i> ATCC 25497	0.178	0.108	0.178	0.189	0.157	0.189	0.127	0.147	0.167	0.137	0.137	0.157	0.168	0.108
28 <i>S. bikiniensis</i> DSM40581	0.079	0.167	0.070	0.099	0.079	0.108	0.137	0.189	0.189	0.168	0.137	0.098	0.157	0.117
29 <i>S. tanashiensis</i> LMG20274 ^T	0.079	0.147	0.088	0.088	0.117	0.127	0.107	0.189	0.211	0.210	0.199	0.147	0.210	0.147
30 <i>S. laurentii</i> LMG19959 ^T	0.099	0.167	0.089	0.119	0.079	0.128	0.137	0.148	0.168	0.148	0.137	0.079	0.137	0.098
31 <i>S. mediolani</i> LMG20093 ^T	0.157	0.008	0.157	0.167	0.199	0.178	0.127	0.178	0.200	0.167	0.157	0.188	0.211	0.167
32 <i>S. flavogriseus</i> CBS101.34 ^T	0.178	0.008	0.178	0.167	0.222	0.178	0.127	0.189	0.211	0.178	0.178	0.210	0.235	0.189
33 <i>S. griseus</i> CBS SS5.34 ^T	0.167	0.000	0.167	0.178	0.210	0.188	0.137	0.178	0.200	0.167	0.168	0.199	0.223	0.178
34 <i>S. syringium</i> LMG 20320 ^T	0.061	0.117	0.061	0.061	0.098	0.098	0.117	0.137	0.137	0.127	0.107	0.127	0.158	0.157

TABLEAU N°27 : suite

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

111

0.099																		
0.167	0.157																	
0.178	0.167	0.008																
0.178	0.178	0.108	0.118															
0.088	0.107	0.168	0.168	0.127														
0.088	0.098	0.107	0.107	0.167	0.098													
0.147	0.127	0.148	0.148	0.147	0.158	0.117												
0.137	0.118	0.148	0.148	0.147	0.148	0.107	0.017											
0.147	0.127	0.089	0.098	0.127	0.147	0.098	0.098	0.079										
0.147	0.127	0.089	0.098	0.127	0.147	0.098	0.098	0.079	0.000									
0.200	0.147	0.099	0.089	0.108	0.188	0.147	0.147	0.147	0.138	0.138								
0.168	0.127	0.061	0.071	0.089	0.147	0.127	0.137	0.137	0.108	0.108	0.071							
0.098	0.117	0.178	0.189	0.117	0.079	0.137	0.148	0.158	0.167	0.167	0.188	0.157						
0.079	0.117	0.168	0.168	0.127	0.008	0.088	0.168	0.158	0.147	0.147	0.188	0.147	0.079					
0.108	0.127	0.138	0.148	0.079	0.079	0.137	0.168	0.178	0.167	0.167	0.167	0.118	0.034	0.079				
0.137	0.118	0.098	0.108	0.117	0.137	0.088	0.088	0.070	0.008	0.008	0.128	0.098	0.157	0.137	0.157			
0.137	0.137	0.098	0.108	0.137	0.157	0.088	0.108	0.088	0.008	0.008	0.148	0.118	0.178	0.157	0.178	0.017		
0.147	0.127	0.089	0.098	0.127	0.147	0.098	0.098	0.079	0.000	0.000	0.138	0.108	0.167	0.147	0.167	0.008	0.008	
0.117	0.107	0.169	0.158	0.147	0.138	0.147	0.089	0.070	0.117	0.117	0.137	0.138	0.127	0.138	0.147	0.107	0.127	0.117

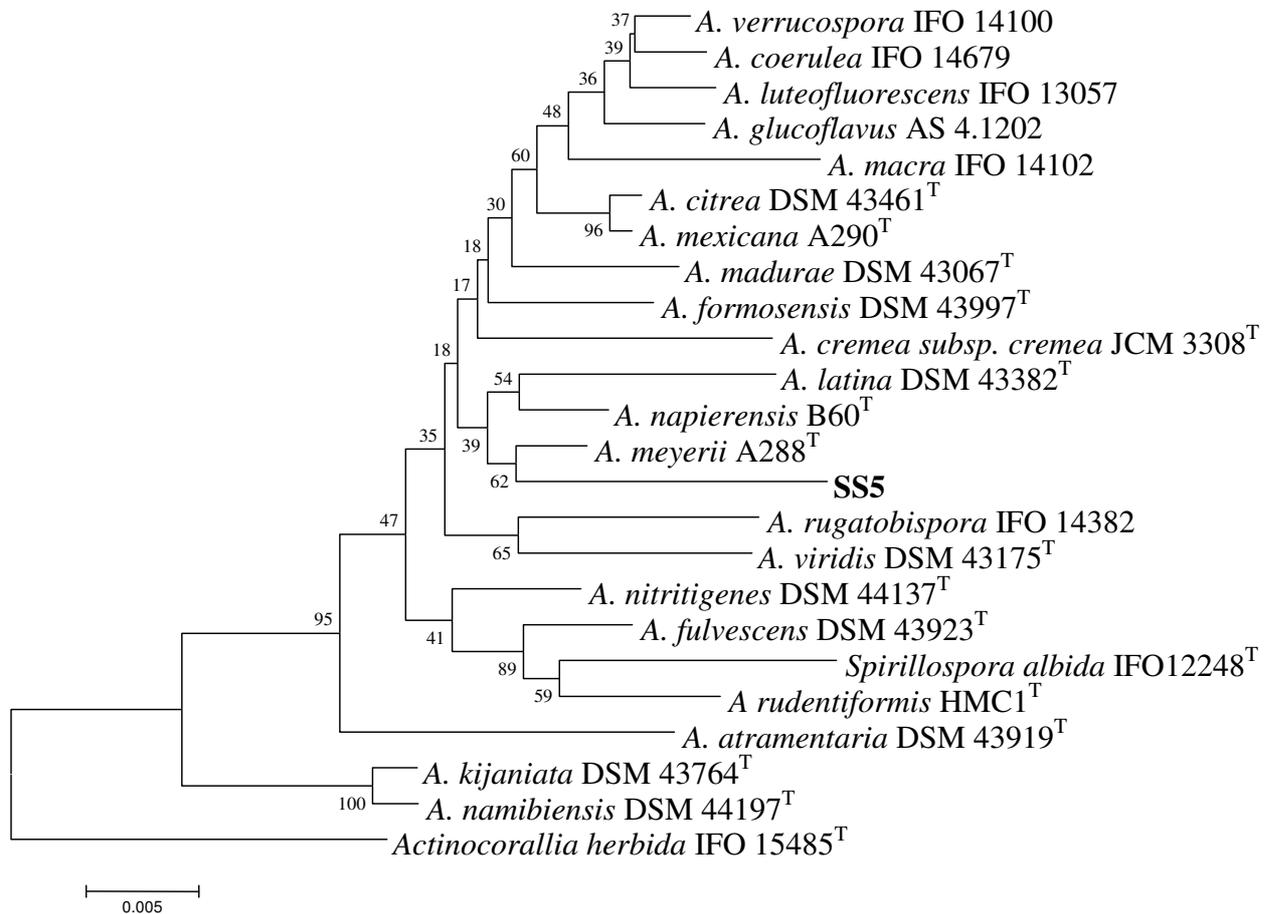


FIGURE N°28 : Arbre selon la méthode des distances (**Neighbor-Joining**) construit d'après l'analyse des séquence d'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 3.1 (**Kumar, Tamura, Nei 2004**) montrant la position phylogénétique de l'isolat SS5 parmi les espèces représentatives du genre *Actinomadura*. La matrice des distances est calculée selon le model Kimura à 2 paramètres (**Kimura, 1980**). Les valeurs mentionnées à l'origine des nœuds représentent le pourcentage après 1000 bootstrap. *Actinocorallia herbida* est utilisée comme outgroupe 0,005 représente le nombre de substitution par position de nucléotide.

TABLEAU N°28: Matrice des distances calculées à partir des séquences de l'ARNr 16S des bactéries du genre *Actinomadura*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>A. kijaniata</i> DSM 43764 ^T														
2 <i>A. atramentaria</i> DSM 43919 ^T	0.034													
3 <i>A. namibiensis</i> DSM 44197 ^T	0.004	0.034												
4 <i>A. glucoflavus</i> AS 4.1202	0.037	0.033	0.037											
5 <i>A. macra</i> IFO 14102	0.042	0.038	0.043	0.019										
6 <i>Spirillospora albida</i> IFO12248 ^T	0.035	0.038	0.036	0.036	0.039									
7 <i>A. luteofluorescens</i> IFO 13057	0.037	0.034	0.038	0.008	0.016	0.037								
8 <i>A. rudentiformis</i> HMC1 ^T	0.030	0.035	0.029	0.029	0.033	0.019	0.031							
9 <i>A. verrucospora</i> IFO 14100	0.035	0.033	0.036	0.011	0.015	0.033	0.006	0.028						
10 <i>A. cremea</i> subsp. <i>Cremea</i> JCM 3308 ^T	0.033	0.033	0.033	0.019	0.028	0.032	0.023	0.030	0.023					
11 <i>A. rugatobispora</i> IFO 14382	0.032	0.033	0.033	0.028	0.028	0.033	0.024	0.028	0.022	0.028				
12 <i>A. fulvescens</i> DSM 43923 ^T	0.029	0.030	0.029	0.024	0.029	0.020	0.024	0.012	0.021	0.031	0.025			
13 <i>A. coerulea</i> IFO 14679	0.037	0.033	0.038	0.009	0.014	0.037	0.007	0.030	0.006	0.022	0.024	0.024		
14 <i>A. viridis</i> DSM 43175 ^T	0.038	0.029	0.038	0.022	0.026	0.033	0.022	0.028	0.022	0.028	0.021	0.024	0.023	
15 <i>A. madurae</i> DSM 43067 ^T	0.034	0.028	0.034	0.016	0.020	0.032	0.016	0.021	0.016	0.023	0.027	0.022	0.017	0.019
16 <i>A. citrea</i> DSM 43461 ^T	0.034	0.028	0.034	0.009	0.019	0.034	0.012	0.029	0.012	0.019	0.024	0.021	0.011	0.022
17 <i>A. latina</i> DSM 43382 ^T	0.034	0.034	0.034	0.030	0.031	0.032	0.031	0.029	0.029	0.029	0.028	0.028	0.031	0.030
18 <i>A. mexicana</i> A290 ^T	0.034	0.028	0.034	0.008	0.019	0.033	0.011	0.029	0.011	0.019	0.024	0.023	0.010	0.022
19 <i>A. formosensis</i> DSM 43997 ^T	0.036	0.024	0.035	0.016	0.022	0.029	0.019	0.025	0.016	0.021	0.023	0.019	0.017	0.022
20 <i>A. nitritigenes</i> DSM 44137 ^T	0.024	0.033	0.024	0.021	0.027	0.022	0.022	0.019	0.019	0.026	0.025	0.014	0.020	0.026
21 <i>A. napierensis</i> B60 ^T	0.028	0.027	0.027	0.019	0.025	0.024	0.020	0.023	0.019	0.019	0.019	0.019	0.020	0.022
22 <i>A. meyerii</i> A288 ^T	0.028	0.027	0.028	0.016	0.023	0.029	0.017	0.022	0.015	0.020	0.019	0.018	0.017	0.022
23 <i>Actinocorallia herbida</i> IFO 15485	0.035	0.044	0.034	0.051	0.054	0.047	0.051	0.043	0.046	0.051	0.052	0.040	0.049	0.056
24 SS5	0.038	0.040	0.039	0.028	0.034	0.036	0.029	0.033	0.028	0.029	0.030	0.030	0.029	0.033

1997 ; Kim *et al.*, 1999) a confirmé en partie la classification phénotypique, mais cette approche a également fourni de nouvelles informations. Anderson et Wellington (2001) ont revu et récapitulé toutes les approches pour clarifier la taxonomie des *Streptomyces* ; cependant, ce champ demeure légèrement confus.

Les *Streptomyces* sont des bactéries aérobies à coloration de Gram positive, qui poussent en produisant un mycélium végétatif (mycélium de substrat) ramifié et un mycélium aérien portant des chaînes d'arthrospores. Le mycélium de substrat et les spores peuvent être pigmentés, mais peuvent produire également des pigments diffusibles (Williams *et al.*, 1989). Le pourcentage GC% est compris entre 69-78 % (Williams *et al.*, 1989).

La souche **ES4** isolée de l'eau de Sebkha, possède un mycélium primaire non fragmenté et non sporulé. Elle possède un mycélium aérien qui porte de longues chaînes de spores (plus de 15 spores) de type rectiflexible avec une absence totale de sporanges ou de sclérotés. Elle se développe bien sur la plupart des milieux de cultures y compris le milieu à base de farine d'avoine (ISP 3), le milieu glycérol-asparagine (ISP5) et le milieu extrait de levure-extrait de malte (ISP2) (Tableau N° 19).

La morphologie de la souche **ES4** nous rapproche des *Streptomyces* et genres apparentés. La couleur des colonies est dans les temps gris ce qui nous permet de la classer dans la série grise proposée par Shirling et Gottlieb de l'International Streptomyces Project (ISP). Aucun pigment diffusible n'a été produit sur aucun des milieux de culture utilisés (Figure 23a et 23b).

La souche **SS4** isolée du sol de sebkha se développe bien sur la plupart des milieux de culture utilisés (Tableau N° 20). Elle a montré une faible croissance sur les milieux ISP3 et ISP4. Un pigment jaune diffusible était produit sur tous les milieux de culture (Figure 23a et 23b).

L'observation macroscopique de la souche cultivée sur tous les milieux de culture et l'examen microscopique des colonies sur le milieu Glucose Asparagine en utilisant la technique des lamelles révèlent l'appartenance de la souche **SS4** à la famille des *Streptomycetaceae*. Le mycélium de substrat était bien développé de couleur jaune à brun foncé. Le mycélium aérien est peu développé. Il porte de longues chaînes de spores. Les spores isolées ne présentent aucune mobilité. A maturité la masse sporale était de couleur beige vert amande à gris selon le milieu de culture. L'acide LL-diaminopimélique est le composé caractéristique du peptidoglycane de la paroi des bactéries du genre *Streptomyces* (Lechevalier et Lechevalier, 1970). Les parois cellulaires des souches **ES4** et **SS4** contiennent de l'acide LL-diaminopimélique et de la

glycine, indiquant qu'elles possèdent le type de paroi I (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**). Les hydrolysats cellulaires contiennent principalement le galactose et le glucose mais aucun sucre caractéristique (**Tableau N°22**). Ainsi, les données chimiotaxonomique et phénotypiques nous permettent d'assigner les souches **ES4** et **SS4** au genre *Streptomyces*. Ce qui a été d'ailleurs confirmé par l'analyse phylogénétique.

L'analyse des séquences des gènes codants pour l'ARNr (16S, 23S, et 5S) et en particulier le gène de l'ARNr 16S, est devenue un outil important dans l'identification bactérienne, puisqu'elle fournit des informations sur l'emplacement phylogénétique des espèces (**Woese, 1987 ; Brenner et al., 2001**). Les séquences d'ADN des gènes ribosomal sont fortement conservées, mais ses gènes contiennent également des régions variables, qui parfois peuvent être utiles pour la discrimination entre les espèces (**Stackebrandt et Goebel, 1994 ; Rosselló-Mora et Amann, 2001**).

La séquence du gène ARNr 16S pour la souche **ES4** a été alignée à l'aide du logiciel **clustalw 1,6** avec les séquences des espèces représentatives du genre *Streptomyces* disponibles au niveau des bases de données (**GenBank, EMBL et DDBJ**) en utilisant le programme **Blast** (**Altschul et al., 1997**).

L'analyse phylogénétique basée sur un ensemble de plus de **1378 pb** non ambigus a montré que l'isolat **ES4** se place dans la même branche phylogénétique que *S. bikiniensis*, *S. laurentii* et occupe une ligne phylogénétique commune avec l'espèce *S. viridobruneus* (98 % de similitude)(**Figure N° 26** et **Tableau N° 25**).

L'analyse moléculaire qui donne des pourcentages de similitude de 99 % (**Tableau N° 25**) entre la souche **SS4** et les espèces *S. griseus*, *S. setonii* et *S. caviescabies* est confirmée par l'emplacement de ses dernières sur la même ligne phylogénétique de l'arbre obtenu par l'algorithme de **Neighbor-Joining** (**Figure N° 26**).

Kataoka et al., (1997) ont utilisé la région **hypervariable γ** du gène de l'ARNr 16S pour créer un index pour l'identification des espèces de *Streptomyces*. Un autre arbre phylogénétique a été construit avec les séquences de 120 nucléotides de la région **hypervariable γ** (nucléotides **158-277**) de l'ARNr 16S de la souche **ES4** et des souches représentatives obtenues par le programme **blast**. Cette région spécifique est discriminante pour les espèces du genre *Streptomyces* (**Kataoka et al., 1997 ; Anderson et al., 2001**) (**Figure N° 27**). Il ressort de l'arbre obtenu que la souche **ES4** occupe une ligne phylogénétique indépendante ce qui nous permet de conclure que la souche **ES4** est différente de *S. viridobruneus*. Elle représente probablement une nouvelle espèce du genre *Streptomyces*.

Cette conclusion est consolidée par les valeurs des distances qui séparent l'isolat ES4 de *S. viridobruneus*, obtenues à partir des séquences de l'ARNr 16S ainsi que celles obtenues à partir des séquences de la région hypervariable γ de l'ARNr 16S qui sont de l'ordre de 0,005 et 0,034 respectivement. Les valeurs trouvées sont très élevées pour deux espèces identiques, si nous les comparons à la distance qui sépare l'espèce *S. bobili* de l'espèce *S. galilaeus* qui est égale à 0,001 d'une part (**Tableau N° 26**) et d'autre part si nous considérons les distances obtenues à partir des séquences de la région discriminante γ (**Tableau N° 27**), la valeur de la distance qui sépare l'isolat ES4 (0,034) est égale à la distance qui sépare les espèces *S. parvisporogenes* de *S. olivoreticuli* à titre d'exemple, et trop élevée par rapport à la valeur des distances (0,017) séparant *S. flavogriseus* (qui fait partie du troisième sous groupe celui de *S. halstedii* du groupe majeur (Catégorie I) du genre *Streptomyces* d'après (**Williams et al., 1989**)), de *S. mediolani*, qui fait partie de la série jaune c'est-à-dire la catégorie III qui regroupe les espèces indépendantes d'après **Williams et al., 1989**.

Sur la **figure 27** qui représente l'arbre phylogénétique construit à partir des séquences de 120 nucléotides de la région **hypervariable γ** on remarque que la souche **SS4** se place sur la même ligne phylogénétique avec les trois espèces suscitées, donc cette région aussi n'a pas pu différenciée les trois souches c'est-à-dire *S. griseus*, *S. caviescabies* et l'isolat **SS4** (*S. griseus* et *S. setonii* appartiennent au même groupe de *S. anulatus* et donc considérée comme une seule espèce). Cependant, l'information apportée par les séquences de l'ADNr 16S seule, n'est pas suffisante pour l'identification d'espèces (**Rosselló-Mora et Amann, 2001**). Pour cela plusieurs auteurs ont utilisé d'autre techniques et d'autres outils pour l'identification des espèces de *Streptomyces* comme les séquences intergéniques répétitives d'ADN (**rep-PCR**) (**Sadowsky et al., 1996**), et **PCR-RFLP** du gène codant la protéine du choc thermique **65-kDa** (**Steingrube et al., 1997**).

Pour séparer les trois espèces il nous reste l'hybridation qui jusqu'à présent est considérée comme la seule technique discriminante entre les espèces très proches. L'hybridation ADN-ADN est une méthode qui permet d'estimer le degré de parenté entre deux microorganismes. Elle s'est avérée appropriée dans l'investigation des relations entre des taxons étroitement liés, tels que les espèces (**Stackebrandt et Goebel, 1994**). Les souches appartenant à la même espèce auront généralement plus de 70 % d'homologie DNA-DNA (**Stackebrandt et Goebel 1994**). La méthode a été utilisée dans de nombreuses études sur les *Streptomyces* ; dans certains cas elle a montré une bonne corrélation avec l'identification basée sur la morphologie et la physiologie, mais dans d'autres aucune corrélation apparente (**Healy et Lambert, 1991, Doering-Saad et al.,**

TABLEAU N°29 : Propriétés phénotypiques de la souche **SS4**, *S. caviscabies* et *S. setonii*.

Caractéristiques	<i>S. caviscabies</i>	<i>S. setonii</i>	Souche SS4
Couleur des colonies sur ISP2	Doré à brun clair	Gris-jaune	Jaune pale vert amande
Forme des spores	Cylindrique	Ovale ou cylindrique	ND
Morphologie des chaînes de spores	Réctiflexibles	Longue et droite à réctiflexibles	ND
Production de pigment diffusible	Variable	-	+
Coagulation du lait	ND	Faible	+
Peptonisation du lait	ND	-	-
Hydrolyse de l'amidon	ND	+	+
Croissance sur la cellulose	ND	+	ND
Production d'H ₂ S	ND	-	-
Liquéfaction de la gélatine	ND	+	+
Utilisation de :			
Rhamnose	-	+	+
Arabinose	-	+	ND
Fructose	-	+	+
Saccharose	-	-	-
Maltose	-	ND	+
Xylose	-	+	+
Mannitol	-	+	+
Raffinose	+	+	+

ND : Non déterminer

1992 ; Labeda, 1992 ; Labeda et Lyon, 1992 ; Kim *et al.*, 1999 ; Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000).

Malgré que l'hybridation DNA-DNA est une technique utile dans l'identification des espèces du genre *Streptomyces*, elle ne devrait pas être employée seule, en raison de l'instabilité du génome de ces dernières, mais en combinaison avec d'autres techniques (Anderson et Wellington, 2001).

La méthode de l'identification polyphasique c'est-à-dire la combinaison des techniques moléculaires avec les tests morphologiques et biochimiques semble être la plus efficace pour séparer les espèces très proches. Une matrice probabiliste d'identification pour les bactéries du genre *Streptomyces*, basée sur 41 caractères comme les chaînes de spores et la morphologie et la pigmentation des spores, les caractères physiologiques, le pouvoir antibiotique et la résistance aux antibiotiques, ont été développés par Williams *et al.*, (1983).

Ce type d'approche a été appliqué sur des isolats non identifiés, et a permis de placer 80 % de ces derniers dans un groupe donné. Kämpfer *et al.*, (1991), de leur côté, ont étudié un nombre plus important de souches et en utilisant plus de caractères, ils ont comparé leurs résultats avec les données génétiques et chimiotaxonomiques publiées. Goodfellow *et al.*, (1992) ont rajouté à cette méthode des tests enzymatique rapides en utilisant des substrats fluorogéniques. La sensibilité aux bactériophages et la sérologie aussi bien que la caractérisation des acides gras pariétaux peuvent être utiles pour affilier un isolat inconnu au genre *Streptomyces*, cependant, ces méthodes restent insuffisantes pour distinguer les espèces appartenant au même genre (Anderson et Wellington, 2001).

Le tableau 29 montre d'une part que la souche SS4 se différencie de *S. caviescabies* (Goyer *et al.*, 1996), par la production de pigment diffusible, la couleur du mycélium aérien (Jaune pale vert amande), ainsi que l'assimilation des différentes sources de carbone autre que le raffinose, et d'autre part la souche SS4 partage beaucoup de caractères avec *S. setonii*, donc on peu conclure que la souche SS4 appartient au sous groupe de *S. anulatus* c'est-à-dire le sous groupe 2 de la première catégorie (groupe majeur) des bactéries du genre *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1989). Cette conclusion est corroborée par la valeur de la distance, obtenue à partir des séquences de la région hypervariable γ , égale à zéro (0,000) (Tableau 27) qui sépare l'isolat SS4 de *S. setonii*.

Selon toutes les classifications, les bactéries du genre *Streptomyces* peuvent être divisées en trois catégories. La catégorie I qui forme les groupes majeurs regroupe 23 sous groupes. Chaque sous groupe est représenté par une espèce type, chacune d'entres elles regroupe plusieurs espèces synonymes (six ou plus), la catégorie II ou groupes

mineurs est formée de 20 sous groupes regroupant des espèces types, chacune d'elles regroupe deux à cinq espèces synonymes et la troisième catégorie regroupe des espèces indépendantes regroupées selon plusieurs séries de couleurs différentes (blanc, noir, gris, rouge, jaune, bleu..). Le nombre et la composition des groupes varient selon l'approche utilisée, mais le groupe majeur semble être tout à fait cohérent. (**Anderson et Wellington, 2001**).

Le plus grand sous groupe est celui de *Streptomyces albidoflavus*, qui regroupe 71 espèces et a été divisé en sous groupes. Les plus importants de ces derniers sont *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces anulatus* et *Streptomyces halstedii* (**Williams et al., 1983**).

Le genre *Actinomadura* appartient à la famille des *Thermomonosporaceae* (**Stackebrandt et al., 1997**) modifié par **Zhang et al., en (2001)** qui comprend également les genres *Actinocorallia* (**Iinuma et al., 1994**) modifié par **Zhang et al., en (2001)**, *Spirillospora* (**Couch, 1963**) et *Thermomonospora* (**Henssen, 1957**) modifié par **Zhang et al., en (2001)**.

L'application des différents types de taxonomie (Taxonomie phénétique, numérique, chimique et moléculaire) a clarifié la taxonomie du genre *Actinomadura* et genre apparentés (**Kroppenstedt et al., 1990 ; Ochi et al., 1991 ; Poschner et al., 1985 ; Trujillo et Goodfellow, 1997 ; Trujillo et Goodfellow, 2003 ; Zhang et al., 2001**).

Les membres de ces genres forment une ligne phylogénétique distincte dans l'arbre construit à partir des séquences du gène de l'ARNr 16S (**Zhang et al., 1998 ; Zhang et al., 2001**), et peuvent être distingués les uns des autres en utilisant une combinaison de caractères biochimiques, chimiques, morphologiques et physiologiques (**Trujillo et Goodfellow, 2003 ; Zhang et al., 1998 ; Zhang et al., 2001**).

Le réservoir principal des actinomadura est le sol (**Chormonova et Preobrazhenskaya, 1981 ; Galantenko et al., 1981 ; Lu et al., 2003**) bien que les membres du genre soient mieux connus comme agents causals d'actinomycétomes (**McNeil et Brown, 1004 ; Trujillo et Goodfellow, 2003**). Il y a peu d'information concernant la distribution et la diversité des espèces d'*Actinomadura*, cependant il est évident que le genre est ubiquitaire (**Trujillo et Goodfellow, 2003 ; Wang et al., 1999**). De même, il y a peu d'information concernant les activités métaboliques de ces bactéries dans les habitats naturels mais leur large distribution suggère un rôle important dans le sol.

La souche **SS5** isolée du sol de Sebkhha est une bactérie filamenteuse, aérobie à coloration de Gram positive. Sa croissance est lente sur la majorité des milieux de

Tableau 30 : Caractères distinctifs entre le genre *Actinomadura* et les genres morphologiquement et biochimiquement similaires.

Caractéristiques	SS5	<i>Actinomadura</i>	<i>Nocardiopsis</i>	<i>Saccharothrix</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Microtetraspora</i>
Fragmentation du mycélium de substrat	-	-	+	+	-	+	-
Sporulation du mycélium aérien		Courtes chaînes de spore	Sporulation totale	Sporulation totale	Longues et variables chaînes de spores	Absence ou sporulation totale	Chaînes de 4 spores
Type de la paroi	III	III	III	III	I	IV	III
Sucre caractéristique	Madurose	Madurose	-	Galactose, mannose, rhamnose	-	Arabinose, galactose	Madurose
Acides Mycolique	ND	-	-	-	-	+	-
Ménaquinones prédominantes	ND	MK-9(H ₄ ,H ₆ ,H ₈)	MK-10(H ₄ ,H ₆ ,H ₈)	MK-9(H ₄) MK-10(H ₄)	MK-9(H ₄ ,H ₆ ,H ₄)	MK-8(H ₄)	MK-9(H ₄ ,H ₆ ,H ₈)
Type de phospholipides	ND	I (IV)	III, IV	II	II	II	IV

culture utilisés. Elle se développe sous forme de colonies très ridées avec un mycélium de substrat abondant, bien développé de couleur beige à jaune claire, le pigment est non diffusible. Le mycélium aérien est peut développé au point d'être inexistant sur certains milieux (**Tableau N° 21 et Figure 24a et 24b**).

L'observation microscopique d'une colonie prélevée du milieu de culture sporulation agar, a révélé la présence d'un mycélium primaire très enchevêtré, très ramifié et non fragmenté avec l'absence totale de structures mobile ou de spores (**Figure 25d**). Le mycélium aérien porte de courtes chaînes de spores formant des crochets.

L'analyse chimiotaxonomique a révélé une paroi de type III avec la présence du méso-DAP et comme sucre caractéristique le madurose (**Tableau N°22**).

La souche **SS5** a montré une combinaison de caractères morphologiques et chimiotaxonomiques typique des bactéries du genre *Actinomadura* (**Tableau N° 30**).

Actuellement le genre *Actinomadura* comprend trente espèces validées et décrites (**Erika et al., 2003**). Les espèces du genre *Actinomadura* peuvent être différencier par une approche taxonomique polyphasique en utilisant une combinaison des données génotypiques et phénotypiques (**Kroppenstedt et al., 1990 ; Lu et al., 2003 ; Zhang et al., 2001**).

La position de l'isolat **SS5** sur l'arbre phylogénétique (**Figure N° 28**) montre qu'il est étroitement lié à l'espèce *Actinomadura meyerii*. Les deux microorganismes ont un degré de similarité très élevé (98 %), valeur non confirmée d'une part par le pourcentage de **bootstrap** obtenu qui est de l'ordre de 62 % et d'autre part la valeur 0,017 qui représente la distance qui sépare l'isolat **SS5** de l'espèce *Actinomadura meyerii* (**Tableau N° 28**). A titre d'exemple la distance qui sépare *Actinomadura meyerii* de l'espèce *Actinomadura napiensis* est de 0,001 valeur inférieure à 0,017. De plus la construction de l'arbre phylogénétique par la méthode **UPGMA** apparente la souche **SS5** à *Actinomadura latina* avec une valeur de **bootstrap** 10 %. Par ailleurs les espèces type d'*Actinomadura citrae* et d'*Actinomadura coerulea* par exemple partagent une similarité de 99 %, qui correspond à une différence de 8 nucléotides sur **1450 pb** pourtant les représentants de ces groupes taxonomiques ont une valeur d'hybridation ADN-ADN de 48% seulement (**Poscher et al., 1985**), valeur bien au-dessous du seuil de 70% recommandé par **Wayne et al., (1987)** pour la différenciation entre les espèces.

Dans la section 30 de la 9^{ème} édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4, 1989, Michael Goodfellow a recommandé l'utilisation de quatre critères morphologique pour différencier les espèces du genre *Actinomadura* : la morphologie des chaînes de spores, surface des spores, la couleur du mycélium aérien

Tableau 31 : Propriétés phénotypiques de la souche **SS5** et *A. myerii*.

Caractéristiques	<i>A. myerii</i>	SS5
Arrangement des spores	Crochet	Crochet
Couleur des colonies sur ISP2		
- Mycélium aérien	Peu abondant	Beige
- Mycélium du substrat	Jaune-crème	Beige
Production de pigment diffusible	-	-
Coagulation du lait	ND	+
Peptonisation du lait	ND	+
Hydrolyse de l'amidon	+	-
Liquéfaction de la gélatine	+	+
Utilisation de :		
- Rhamnose	+	-
- Xylose	+	-
- Raffinose	-	-
- Galactose	-	-
- Fructose	+	-
- Maltose	+	-
Croissance à pH :		
- 5,3	-	+
- 7	+	+
- 9	+	+
- 12,3	-	+

ND : Non déterminer

après maturation des spores et enfin la couleur du mycélium du substrat. Il dit que les caractères physiologiques ont un rôle secondaire à cause de l'indisponibilité de l'information.

Le **tableau 31** montre que la souche **SS5** se différencie de la souche *Actinoadura meyerii* par plusieurs caractères biochimiques et physiologiques. C'est ce qui nous permet de conclure que l'isolat **SS5** représente probablement une nouvelle espèce.

Pour confirmer cette conclusion il faut procéder à une hybridation entre l'ADN de l'isolat **SS5** et celui d'*Actinoadura meyerii*. C'est le but de nos travaux d'avenir.

ETUDE PRELIMINAIRE DES ANTIBACTERIENS
PRODUITS PAR LES SOUCHES REPRESENTATIVES

TABLEAU N°32 : Activité antibactérienne des isolats ES4, SS4 et SS5, en fonction des milieux de production, vis-à-vis des bactéries-tests.

Milieu de production des substances bioactives	Isolats	Diamètres des zones d'inhibition contre :					
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>S. faecalis</i> ATCC 19433	<i>S. aureus</i> Mu 50	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
AF	ES4	12	09	06	12	11	16
	SS4	09	06	06	08	10	12
	SS5	18	17	19	18	17	16
Bennett	ES4	12	09	06	14	12	16
	SS4	17	10	06	17	12	19
	SS5	22	19	20	19	18	21
SF	ES4	06	22	06	06	06	06
	SS4	10	06	06	10	11	15
	SS5	20	18	20	18	20	20
GBA	ES4	14	06	06	14	14	16
	SS4	12	06	06	09	12	18
	SS5	20	17	20	17	20	20
GELM	ES4	08	06	06	12	07	11
	SS4	10	06	06	11	09	13
	SS5	20	17	19	17	20	20
NPH	ES4	10	06	06	06	07	09
	SS4	09	06	06	08	08	12
	SS5	18	16	17	16	16	17

Résultats et Discussion

1- Choix du milieu de production d'antibactériens

L'ensemble des facteurs nutritionnels et environnementaux qui influent sur la production des antibiotiques permettent de mettre en évidence certains traits majeurs, avec cependant de nombreuses exceptions (**Iwai et Omura, 1982**). En effet le nombre de souches productrices est trop diversifié et les voies de biosynthèse trop multiples pour pouvoir dégager des règles uniques. D'une façon générale, les conditions optimales pour la production des antibiotiques ne sont pas nécessairement identiques à celles permettant une bonne croissance. Les zones optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement plus étroites que pour la croissance et varient avec la souche utilisée et le métabolite secondaire synthétisé. Comme les besoins nutritionnels et les conditions de culture d'un microorganisme ne sont généralement pas les mêmes pendant la phase de croissance et pendant la phase de production des métabolites secondaires, des milieux offrant un bon compromis ont dû être développés. Dans cette optique nous avons testé les milieux (**AF, Bennett, SF, GBA, GELM et NPH**) pour choisir parmi ces derniers ceux qui donnent une meilleure production des antibiotiques par les isolats **ES4, SS4 et SS5**.

1-1-Activité antibactérienne des trois isolats

Il en ressort des résultats présentés dans le **tableau n° 32** que :

- les cylindres d'Agar des isolats (**ES4, SS4 et SS5**) prélevés des six milieux de culture testés pour la production d'antibactériens ont montré une activité inhibitrice contre au moins une bactérie-tests utilisée,

- pour l'isolat **ES4**, le plus grand diamètre (22 mm) de la zone d'inhibition a été obtenu contre *P. vulgaris* ATCC 13315 avec les cylindres d'Agar prélevés du milieu SF,

- pour les isolats **SS4 et SS5**, les plus grandes zones d'inhibition obtenues (de diamètres 19 et 22 mm contre *S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922 respectivement) ont été provoquées par les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu de Bennett,

- les plus faibles diamètres des zones d'inhibition ont été obtenus avec les cylindres d'Agar prélevés du milieu de culture NPH, et ce pour les trois souches (**ES4, SS4 et SS5**).

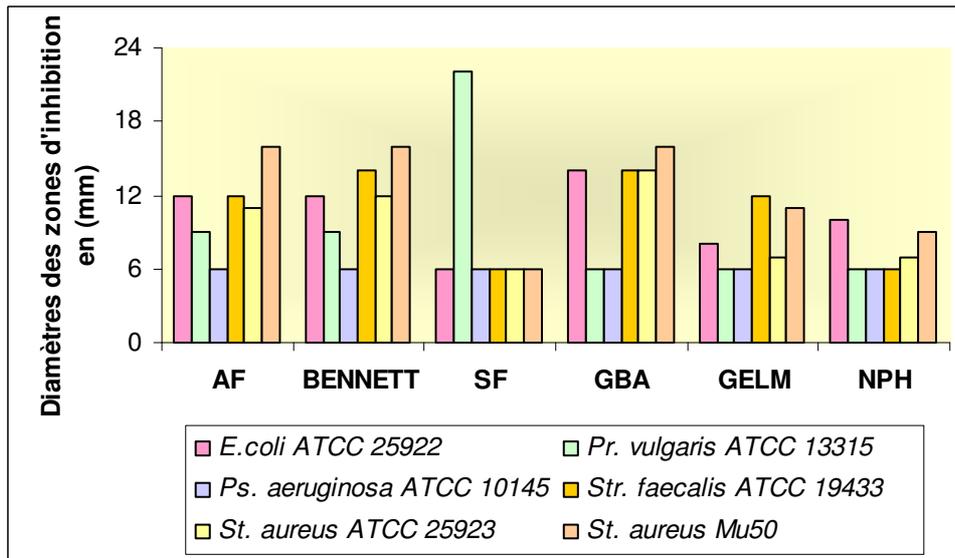


Figure N° 29a : Activité antibactérienne de l'isolat ES4 en fonction des bactéries-tests.

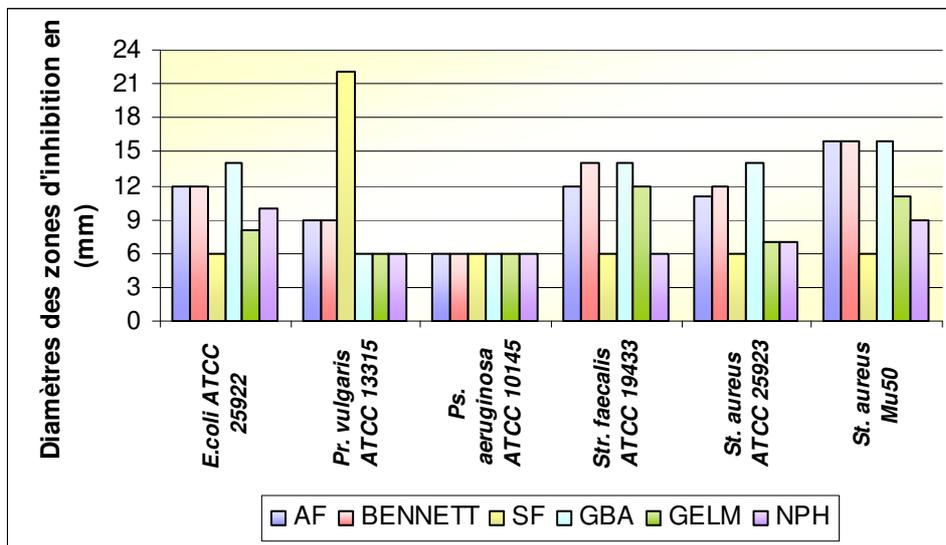


Figure N° 29b : Activité antibactérienne de l'isolat ES4 en fonction des milieux de production vis-à-vis de chaque bactérie-test.

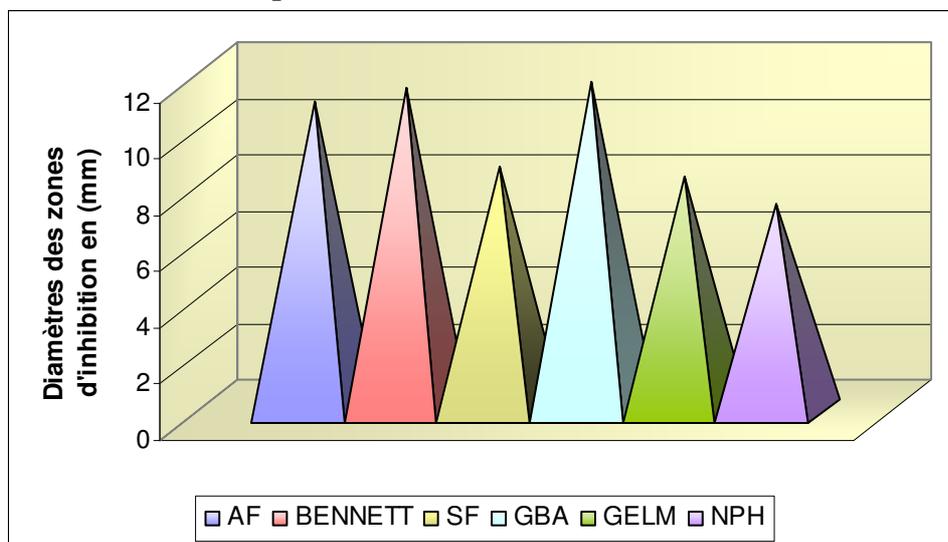


Figure N° 29c : Activité de l'isolat ES4 en fonction des milieux de production.

1-2 l'isolat ES4

Pour l'isolat **ES4**, la plus grande zone d'inhibition a été obtenue contre *Proteus vulgaris* ATCC 13315 par les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu **SF** (**Tableau n° 32 et figures 29a et 29b**). Hormis ce résultat, les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les cylindres d'Agar prélevés à partir des milieux de **Bennett**, **GBA** et **AF** sont les plus importants. Ils dépassent les 15 mm pour les zones d'inhibitions contre *Staphylococcus aureus* Mu 50 (**Figures N° 29a et 29b**). A l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. 83,33 % des cylindres d'Agar de l'isolat **ES4** ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries-tests *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* Mu 50, Tandis que 66,67 % des cylindres d'agar ont montré une activité contre *Streptococcus faecalis* ATCC 19433 et seulement 50 % des cylindres d'agar ont inhibé la bactérie *Proteus vulgaris* ATCC 13315 (**Figure N° 29a et 29b**). Dans l'ensemble les milieux qui favorisent la production d'antibactériens par l'isolat **ES4** sont les milieux **GBA**, **Bennett** et **AF**, les milieux **SF** et **GELM** donnent une production moindre et enfin le milieu **NPH** dans lequel cette production est faible (**Figure N° 29c**).

1-3 l'isolat SS4

En ce qui concerne l'isolat **SS4**, Les cylindres d'Agar prélevés des six milieux de production testés ont inhibés les bactéries-tests utilisées à l'exception de *Proteus vulgaris* ATCC 13315 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (**Figures N° 30a et 30b**) et le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu de **Bennett** contre *Staphylococcus* Mu 50 (**Figures N° 30a et 30b**). 100 % des cylindres d'Agar provenant du milieu de **Bennett** ont inhibé les bactéries-tests utilisées tandis que seulement 66,67 % des cylindres d'Agar prélevés des autres milieux ont montré une activité inhibitrice contre ces mêmes bactéries. Les résultats obtenus, nous permettent de diviser les milieux de production en 3 groupes, le premier formé du milieu de **Bennett** avec lequel nous avons obtenu un diamètre d'inhibition supérieur à 12 mm, les milieux **GBA** et **SF** forment le deuxième groupe dont les cylindres d'Agar provoquent des zones d'inhibition de diamètres compris entre 8mm et 10 mm. En fin le troisième groupe, dont les cylindres d'Agar entraînent des zones d'inhibition de diamètre inférieur à 8 mm, est constitué des milieux **AF** et **NPH** (**Figure N° 30c**).

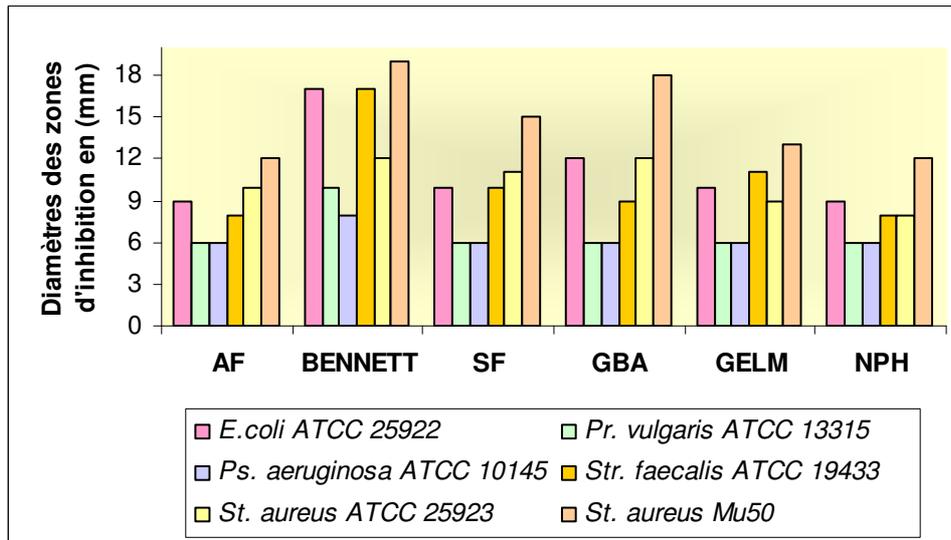


Figure N° 30a : Activité antibactérienne de l'isolat SS4 en fonction des bactéries-tests.

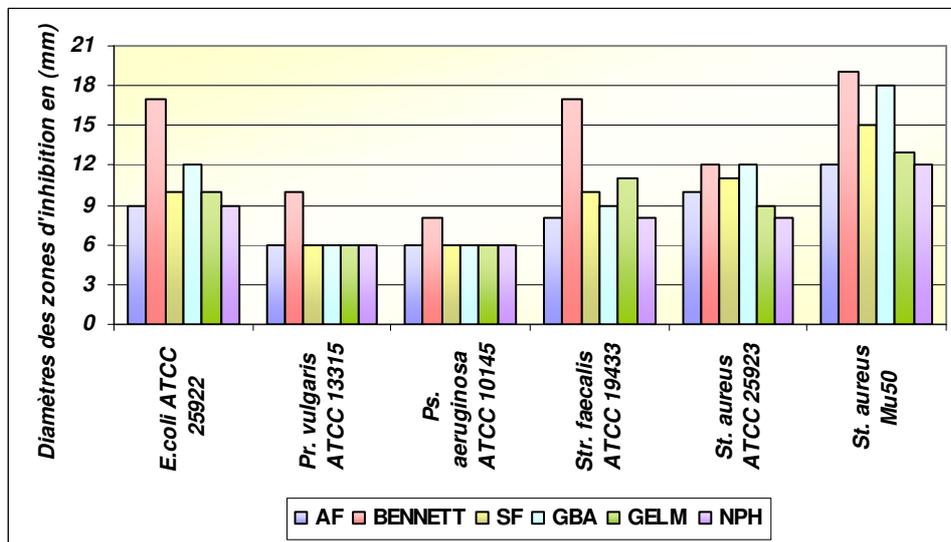


Figure N° 30b : Activité antibactérienne de l'isolat SS4 en fonction des milieux de production vis-à-vis de chaque bactérie-test.

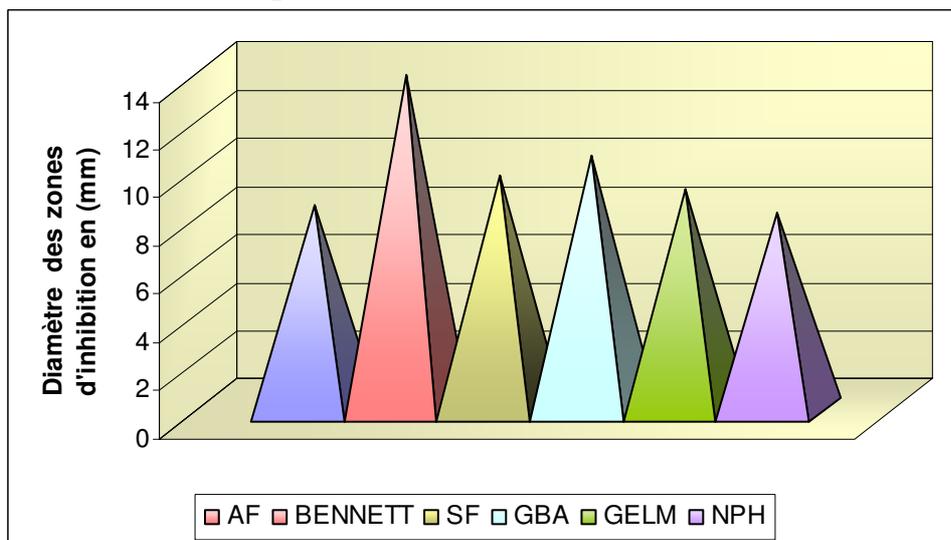


Figure N° 30c : Activité de l'isolat SS4 en fonction des milieux de production.

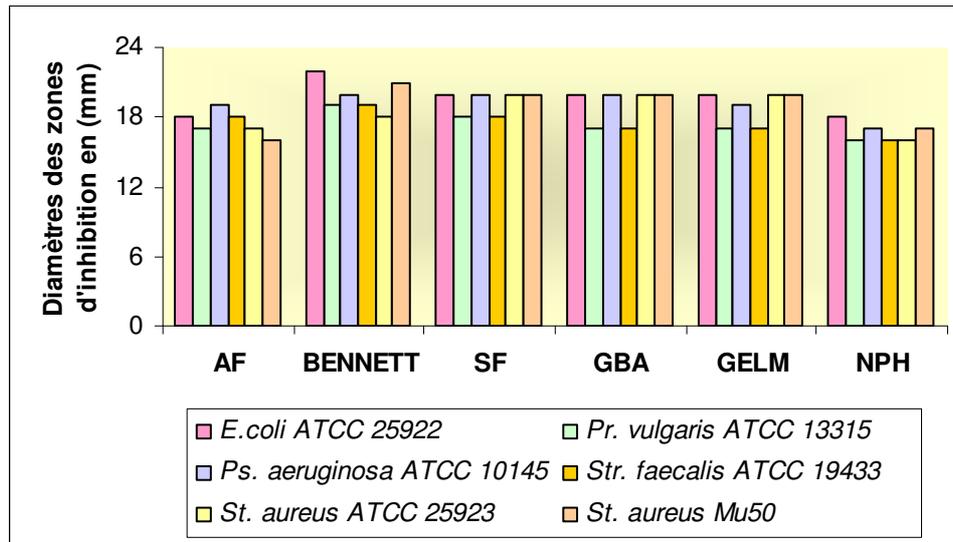


Figure N° 31a : Activité antibactérienne de l'isolat SS5 en fonction des bactéries-tests.

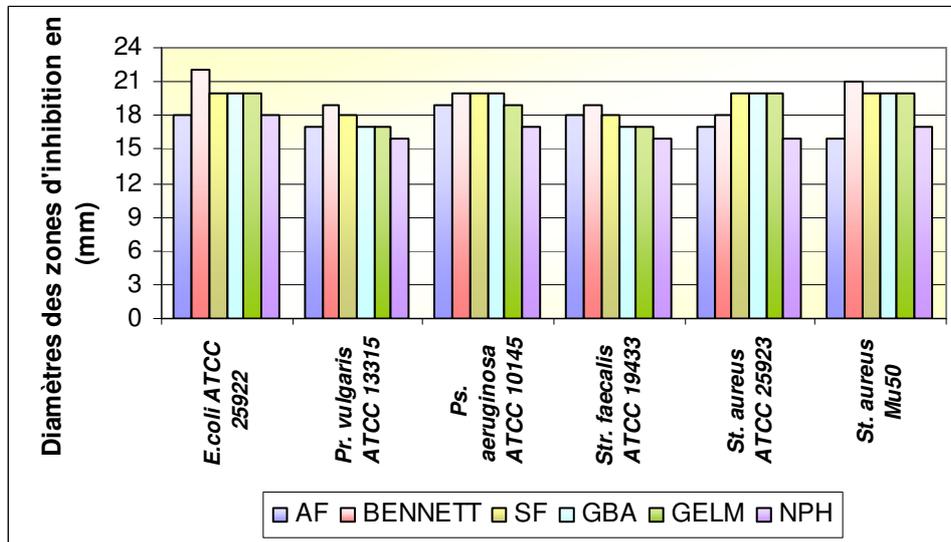


Figure N° 31b : Activité antibactérienne de l'isolat SS5 en fonction des milieux de production vis-à-vis de chaque bactérie-test.

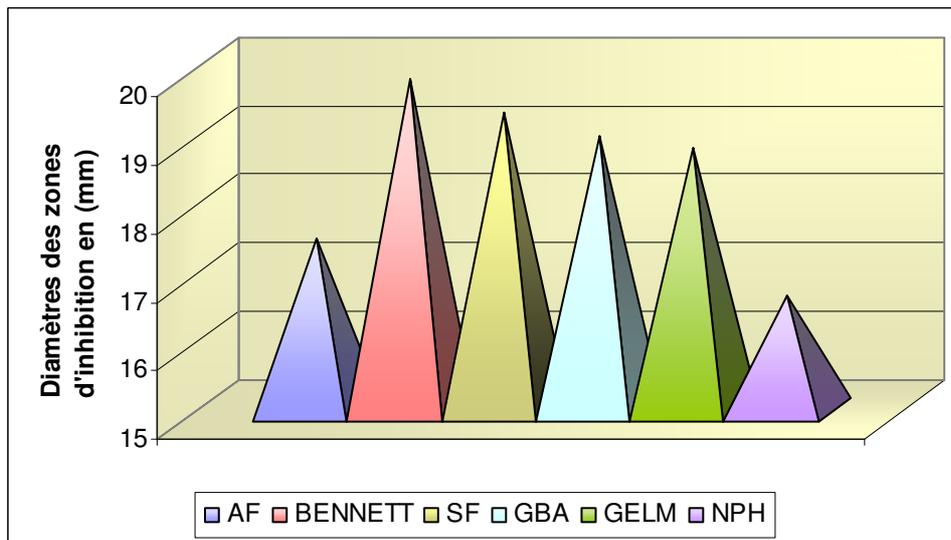


Figure N° 31c : Activité de l'isolat SS5 en fonction des milieux de production.

1-4 l'isolat SS5

Pour l'isolat **SS5**, le plus grand diamètre d'inhibition a été obtenue avec les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu de **Bennett**, il est de 22 mm contre *E. coli* ATCC 25922 et de 21 mm contre *St. aureus* Mu 50 (**Figures N° 31a et 31b**). Les cylindres d'Agar prélevés des cinq milieux de production testés (**AF, SF, GBA, GELM, NPH**) ont tous produit des zones d'inhibitions très importantes (supérieur à 16 mm), et cela contre toutes les bactéries-tests utilisés. 100 % des cylindres d'Agar de l'isolat **SS5** ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries-tests (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* Mu 50), tandis que seulement 83,33 % des cylindres d'agar ont montré une activité inhibitrice contre *Pr. Vulgaris* ATCC 13315, *Ps. aeruginosa* ATCC 10145 et *Str. faecalis* ATCC 19433 (**Figures N° 31a et 31b**). Pour l'isolat **SS5**, tous les milieux de production testés ont favorisé la production d'antibactériens par cet isolat ce qui est bien montré sur la **figure 31c** par la moyenne des diamètres d'inhibition supérieur à 16 mm, les milieux de **Bennett, SF, GBA et GELM** sont les milieux de production avec lesquels nous avons obtenu les plus grandes zones d'inhibition mais le milieu de **Bennett** reste le milieu le plus favorable pour la production d'antibactériens, le milieu le moins favorable pour la production d'antibactériens par l'isolat **SS5** est le milieu **NPH** (**Figure N° 31c**).

1-5 Conclusion

D'après la **figure n° 32**, les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des trois isolats confondus sont supérieures à 8 mm ce qui nous permet de dire que les six milieux testés favorisent la production d'antibactériens par les trois isolats étudiés (**ES4, SS4 et SS5**) c'est ce qui explique leur utilisation pour la production des antibiotiques par différents chercheurs (**Shomura et al., 1979 ; Ouhdouch et al., 2001 ; Lemriss et al., 2003**). **La figure n° 32** fait ressortir aussi que le milieu de **Bennett** est le meilleur milieu de production de ces substances bioactives et ceci pour les trois isolats ce qui est en étroite corrélation avec les données bibliographique (**Kitouni et al., 2005 et Barakat et al., 2002**). Pour les trois isolats, le milieu **NPH** est le milieu le moins favorable pour la production d'antibactériens. Le meilleur rendement du milieu de **Bennett** par rapport aux autres milieux peut être expliqué par la richesse de la composition chimique de ce dernier, notamment la présence de l'extrait de viande et des acides aminés de l'hydrolyse acide de la caseine. Au contraire le milieu **NPH** est pauvre, il ne comporte que l'extrait de malt et l'extrait de levure avec comme seule source de carbone, le glucose. Les autres milieux testés sont riches en nutriments pour les microorganismes, c'est ce qui explique

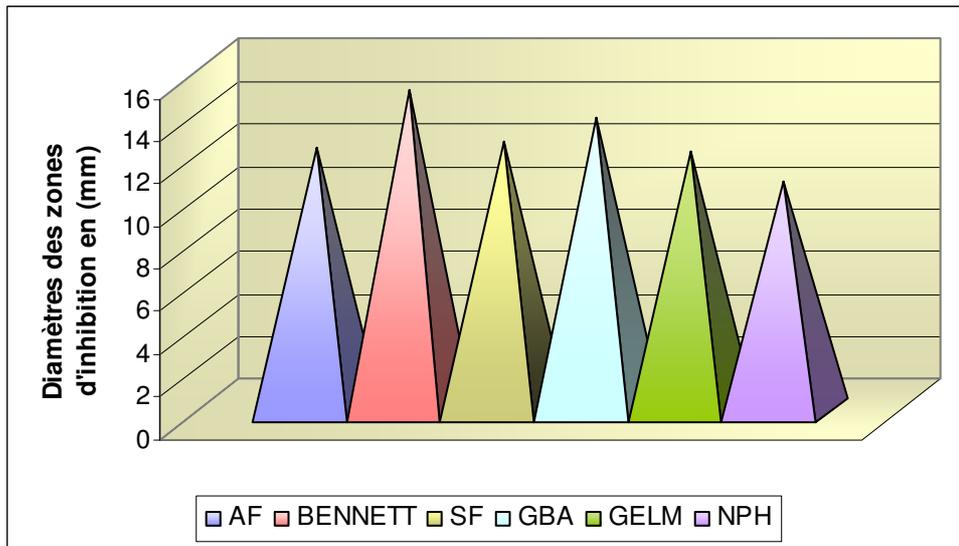


Figure N° 32 : Activité des isolats ES4, SS4 et SS5 en fonction des milieux de production.

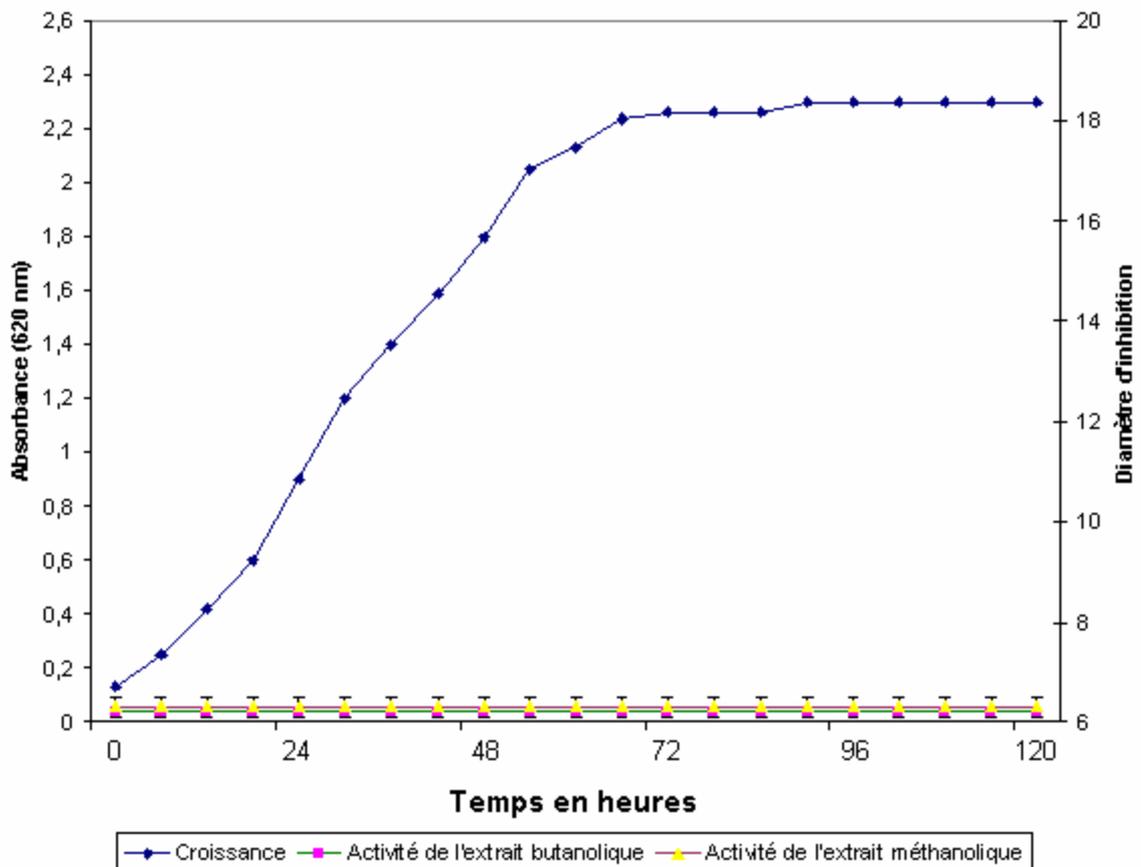


Figure N° 33 : Cinétique de croissance et de production de substances à activité antibactérienne de la souche ES4 en fermenteur de 2 litres

pour l'ensemble des souches une production d'antibactériens relativement importante (**figure n° 32**).

En conclusion, ces résultats nous ont incité à sélectionner le milieu de **Bennett** pour la suite de notre travail.

2- Extraction des biomolécules actives

2-1 Culture en milieu liquide

Les cinétiques de la croissance et de la production de substances actives de la souche **ES4**, cultivée sur le milieu de Bennett en fermenteur de 2 litres, sont présentées sur la **figure n° 33**. La fermentation a duré 5 jours. La phase de latence est pratiquement inexistante, l'absorbance augmente de façon exponentielle pour atteindre un plateau à partir du 3^{ème} jour de fermentation.

La cinétique de croissance, de la souche **ES4**, présentée sur la **figure n° 33** est classique. Elle se divise en deux phases (fermentation biphasique), il y a tout d'abord une phase de croissance logarithmique (trophophase), puis une phase de production des métabolites secondaires (idiophase). A l'exception de l'absence de la phase de latence qui peut être expliquée d'une part, par le fait que la souche s'est adaptée aux constituants du milieu lors de la préculture et d'autre part la présence du glucose, comme source de carbone, qui est facilement assimilable.

Aucune activité antibactérienne n'a été détectée à partir des surnageants de culture, ni des extraits butanoliques des surnageants, ni des extraits méthanoliques du mycélium (**figure n° 33**), cela peut être expliquée soit par l'insensibilité de la technique des puits pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne soit par la présence d'une faible concentration inférieure à la concentration minimale inhibitrice ou encore par l'incapacité de la souche **ES4** à produire des molécules à activité antibactérienne dans les milieux liquide résultat déjà trouvé par d'autres chercheurs (**Shomura et al., 1979 ; Omoto et al., 1979** et **Kuroya et al., 1949**). Afin d'analyser l'activité antibactérienne mise en évidence pour les trois isolats, les souches actinomycétales ont été cultivées sur le même milieu mais gélosé.

2-2 Extraction à partir des milieux gélosés

L'absence d'activité antibactérienne dans les surnageants de culture et les extraits par solvants organiques des mycéliums, nous a obligé à cultiver les trois souches **ES4**, **SS4** et **SS5** sur le milieu de **Bennett** gélosé et extraire les molécules à activité antibactérienne par trois solvants de polarité différente.

Tableau n° 33 : Activité antibactérienne, vis-à-vis des bactéries-tests, des différents extraits organiques des cultures des isolats **ES4**, **SS4** et **SS5** sur le milieu de Bennett gélosé.

Solvant d'extraction	Isolats	Diamètres des zones d'inhibition en mm		
		contre :		
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>S. aureus</i> Mu 50	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Chloroforme	ES4	06	16	17
	SS4	07	14	19
	SS5	06	06	06
Hexane	ES4	06	06	06
	SS4	06	06	06
	SS5	06	15	08
Isoamyl acétate	ES4	06	10	12
	SS4	07	12	11
	SS5	06	15	14

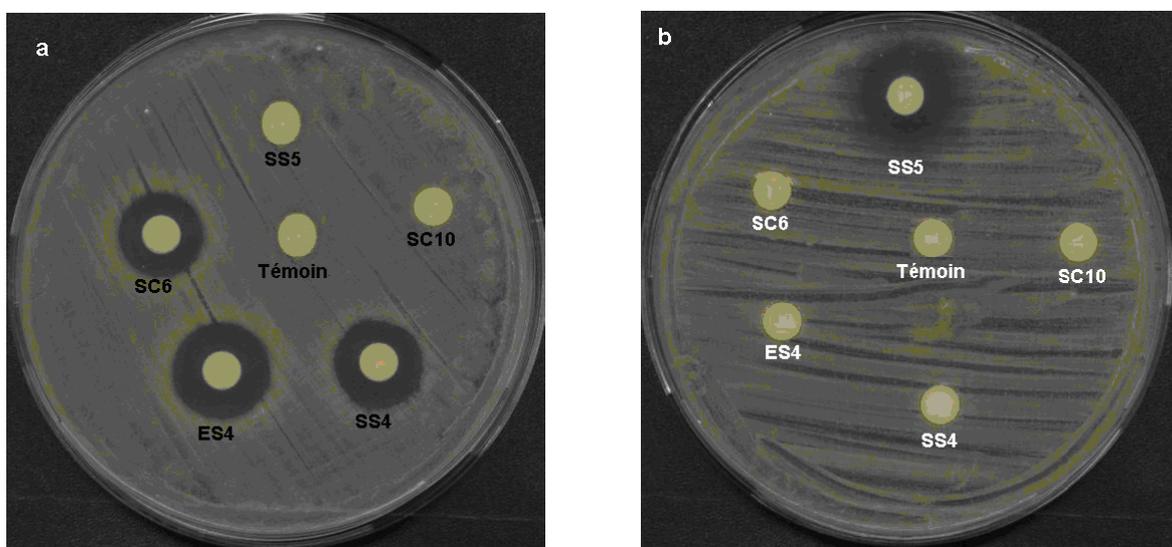


Figure N° 34 : (a) : Activité des extraits chloroformiques des souches **ES4**, **SS4** et **SS5** sur *S. aureus* Mu 50. (b) : Activités des extraits hexanoïques des souches **ES4**, **SS4** et **SS5** sur *S. aureus* Mu 50 :

Trois solvants (le chloroforme, l'hexane et l'isoamyl acétate) ont été utilisés pour l'extraction des molécules actives à partir des boîtes de Pétri contenant le milieu de Bennett préalablementensemencées par les trois isolats **ES4**, **SS4** et **SS5**. Le test d'activité contre les bactéries tests (*Staphylococcus aureus* Mu 50, *S. aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145) a été réalisé par la technique des disques. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau n° 33**. L'activité antibactérienne mise en évidence est illustrée par les **figures 34a et 34b**.

Les extraits hénanoiques des isolats **ES4** et **SS4** n'ont inhibé aucune des bactéries-tests utilisées (**Figures N° 35a, 35b, 35c et 35d**), contrairement des extraits chloroformique et isoamyl acétique. Les plus grands diamètres des zones d'inhibition ont été obtenus par les disques imprégnés des extraits chloroformiques contre les bactéries-tests appartenant au genre *Staphylococcus*. Ils varient de 16 mm à 17 mm pour la souche actinomycétale **ES4** et de 14 à 19 mm pour l'isolat **SS4**, Tandis que les disques imprégnés des extraits isoamyl acétique ont entraîné des zones d'inhibition importantes avec des diamètres maximaux de 12 mm pour les deux isolats **ES4** et **SS4** et ceci contre *Staphylococcus aureus* Mu 50.

Les résultats présentés sur les **figures 36a et 36b** font ressortir l'hexane et l'isoamyl acétate comme les meilleurs solvants pour l'extraction des molécules bioactives produites par la souche **SS5**. La plus grande zone d'inhibition est obtenue avec la bactérie-test *Staphylococcus aureus* Mu 50 par les disques imprégnés par l'extrait hénanoique.

2-3 Séparation des molécules bioactives par chromatographie sur papier

Une tentative de séparation des molécules à activité antibactérienne a été réalisée par la technique de chromatographie ascendante sur papier selon la technique de **Betina (1965)**.

Après développement des chromatogrammes dans les quatre systèmes utilisés, les rapports frontaux calculés sur les chromatogrammes sont réunis dans le **tableau n° 34**.

Les rapports frontaux des molécules bioactives révélés par bioautographie (**Tableau N°34**), nous ont permis de classer les molécules produites par les souches **ES4** et **SS4** dans la **classe Ic** de **Betina** c'est-à-dire la classe de la **streptomycine** qui est un antibiotique appartenant à la famille des aminosides et qui est produit par plusieurs espèces de *Streptomyces* notamment *Streptomyces griseus* qui est en parfaite corrélation avec l'identification de la souche **SS4** à *S. setonii* ou *S. griseus* qui font partie du même

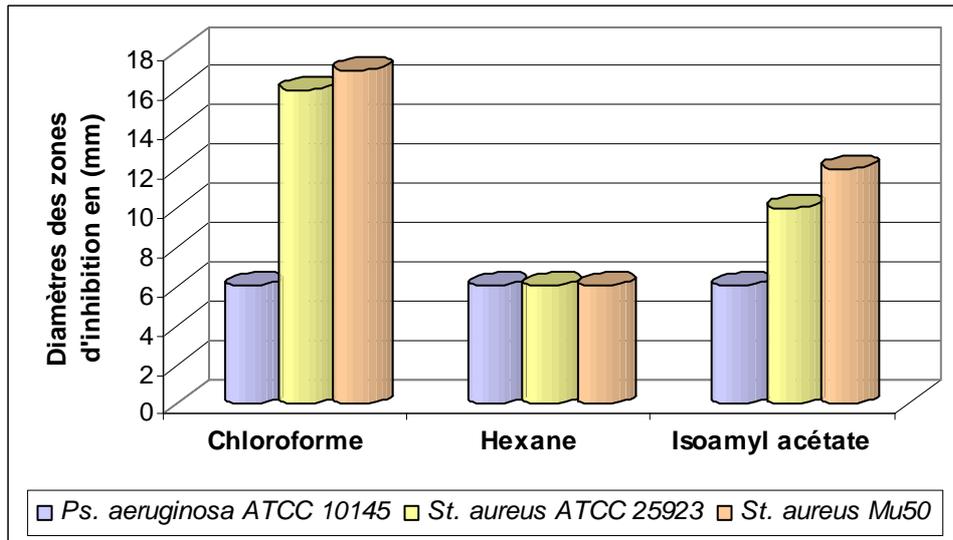


Figure N° 35a : Activité des extraits de l'isolat ES4 en fonction des solvants et des bactéries-tests.

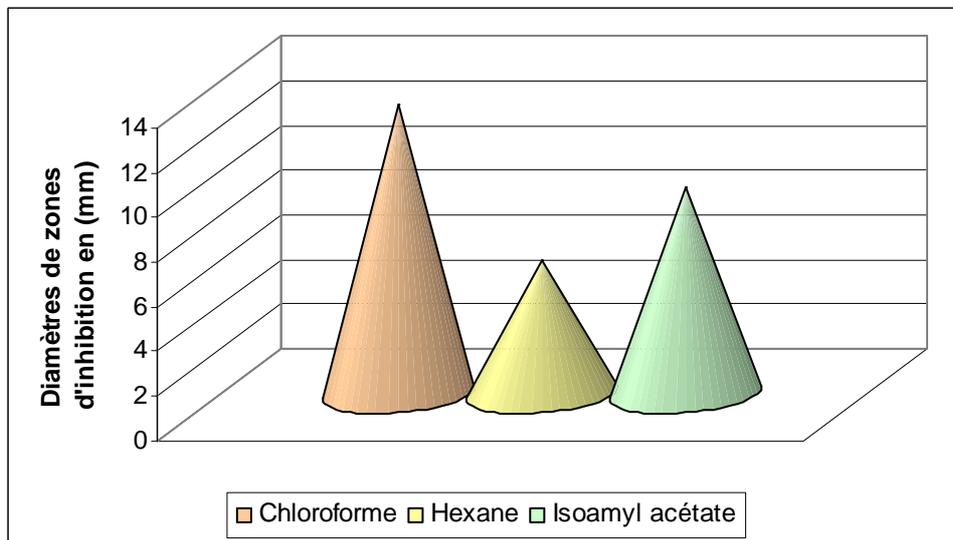


Figure N° 35b : Activité des extraits de l'isolat ES4 en fonction des solvants.

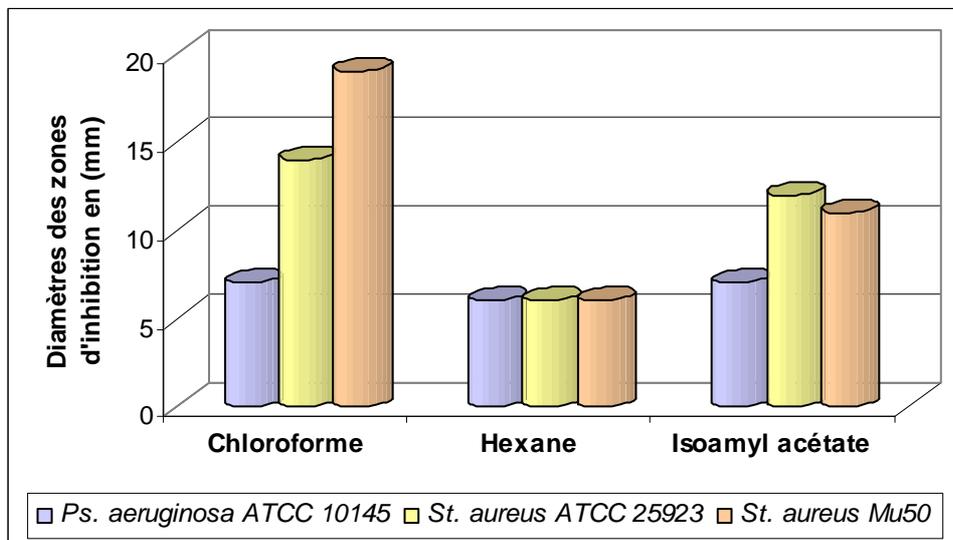


Figure 35c : Activité des extraits de l'isolat SS4 en fonction des solvants et des bactéries-tests.

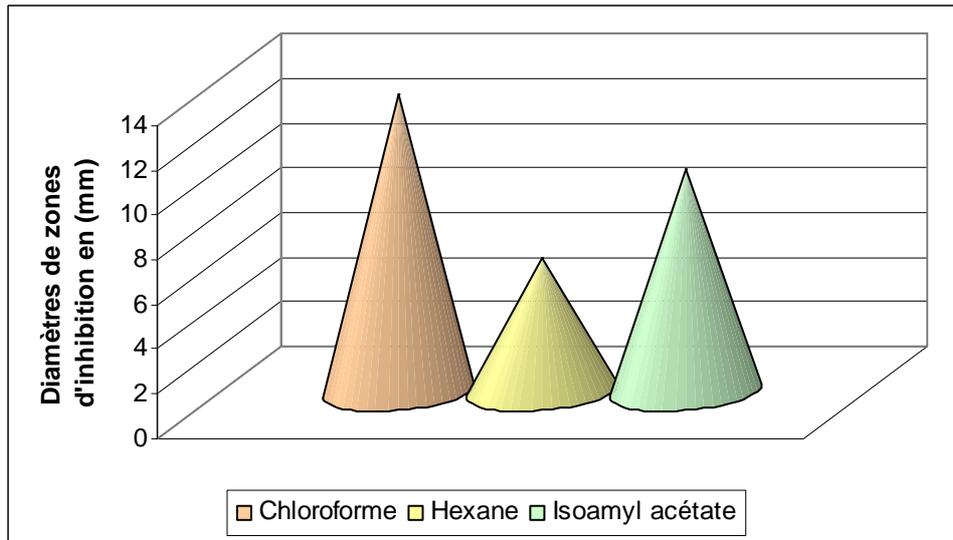


Figure 35d : Activité des extraits de l'isolat SS4 en fonction des solvants.

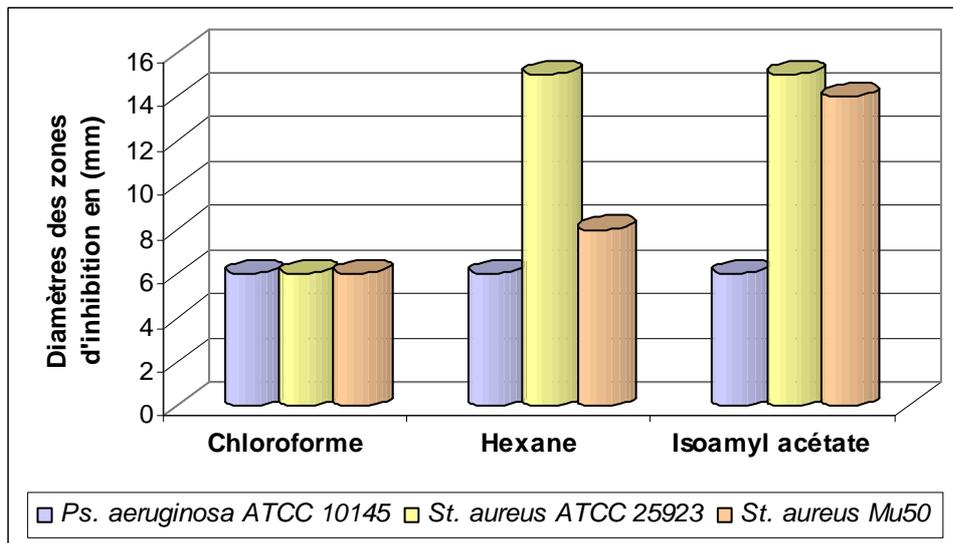


Figure N° 36a : Activité des extraits de l'isolat SS5 en fonction des solvants et des bactéries-tests.

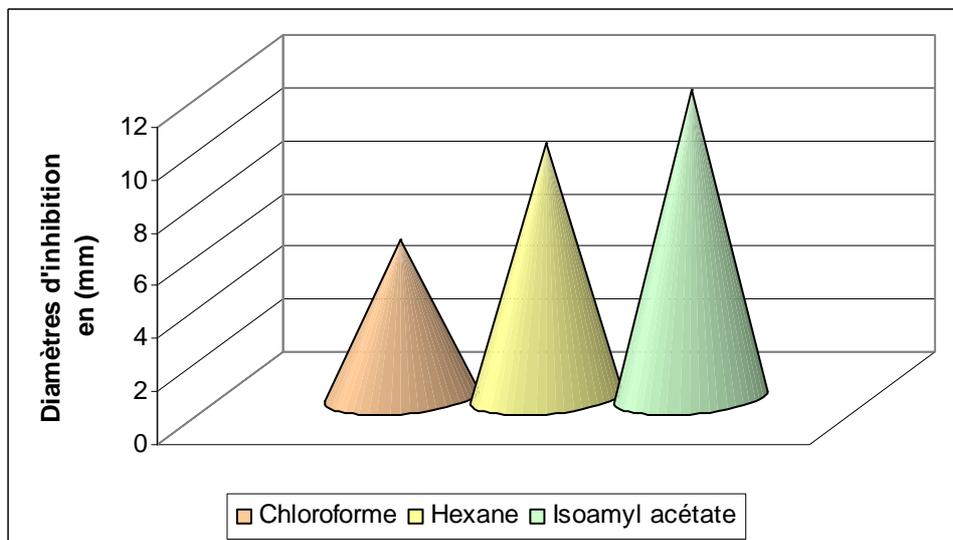


Figure N° 36b : Activité des extraits de l'isolat SS5 en fonction des solvants.

TABLEAU N°34 : Rapport frontaux calculés.

Systèmes de solvants	R _F des extraits actifs révélés par bioautographie		
	ES4	SS4	SS5
1- Eau distillée	00,15	00,06	00,194
2- n-butanol saturé à l'eau	00,00	00,00	00,366
3- Ethyl acétate saturé à l'eau	00,00	00,10	00,866
4- Toluène saturé à l'eau	00,00	00,06	00,366

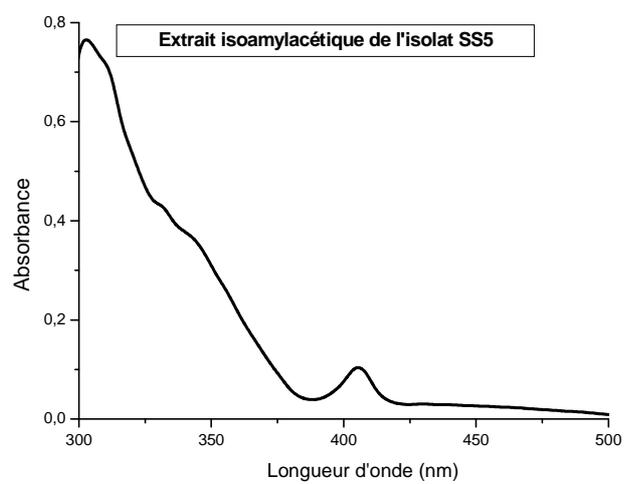
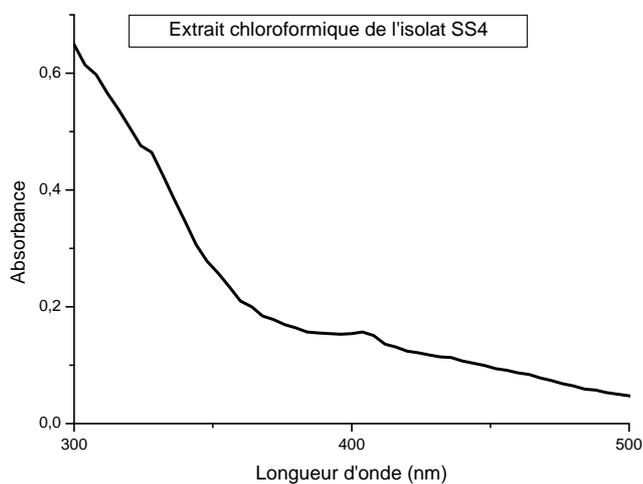
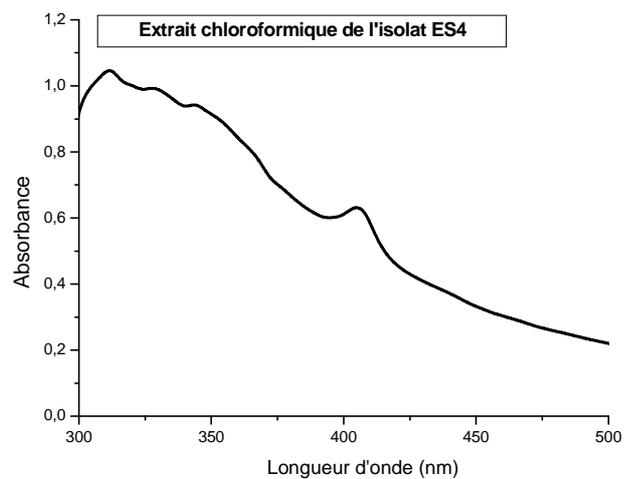


Figure N° 37 : Spectres UV-Visible des extraits actifs des isolats ES4, SS4 et SS5

groupe 2 de **Williams et al., 1989**. La souche du genre *Actinomadura* **SS5** produit une molécule de la **classe IVc** c'est-à-dire l'illudine.

2-4 Spectre UV-Visible des extraits actifs

Les spectres UV-Visible des extraits actifs des souches **ES4**, **SS4** et **SS5** sont présentés dans la **figure N° 37**. Ces spectres UV Visible des antibactériens sont réalisés pour mettre en évidence la présence des doubles liaisons conjugués dans la structure chimique des antibactériens autrement dit savoir si ces antibactériens sont de structure polyènique ou non polyènique. En effet, et d'après **Lindenfelser et al., (1964)**, les maximums d'absorption exprimés en nanomètre (nm) sont :

- pour les tétraènes 290 à 291, 303 à 306, et 318 à 320,
- pour les pentaènes 318-324, 333-338 et 346-358,
- pour les hexaènes 339 à 341, 356 à 358 et 377 à 380,
- pour les héptaènes 358 à 365, 376 à 380 et 399 à 405.

Les spectres UV-Visible présentés sur la **figure n° 37a, 37b et 37c** montrent l'absence des pics caractéristiques des polyènes, nous pouvons donc conclure que les molécules produites par les souches **ES4**, **SS4** et **SS5** **sont de structure non polyénique**.

La variabilité de l'activité antibactérienne, obtenue par la technique des cylindres d'Agar lors de la sélection du meilleur milieu de production d'antibiotiques par les souches **ES4**, **SS4** et **SS5**, laisse croire que chacun des trois isolats produit plusieurs molécules bioactives, chose qui n'est pas vraiment reflétée par les résultats de la chromatographie sur papier qui n'a mis en évidence qu'une seule tache est ceci pour les trois isolats.

2-5 Séparation des substances bioactives par HPLC

Considérant les résultats de la séparation par chromatographie sur papier, les extraits des trois isolats ont été séparés par HPLC et détectés par UV à 220 nm. La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Dans la technique chromatographique mise en jeu, chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation. L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes par la phase solide. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée : il s'agit, dans

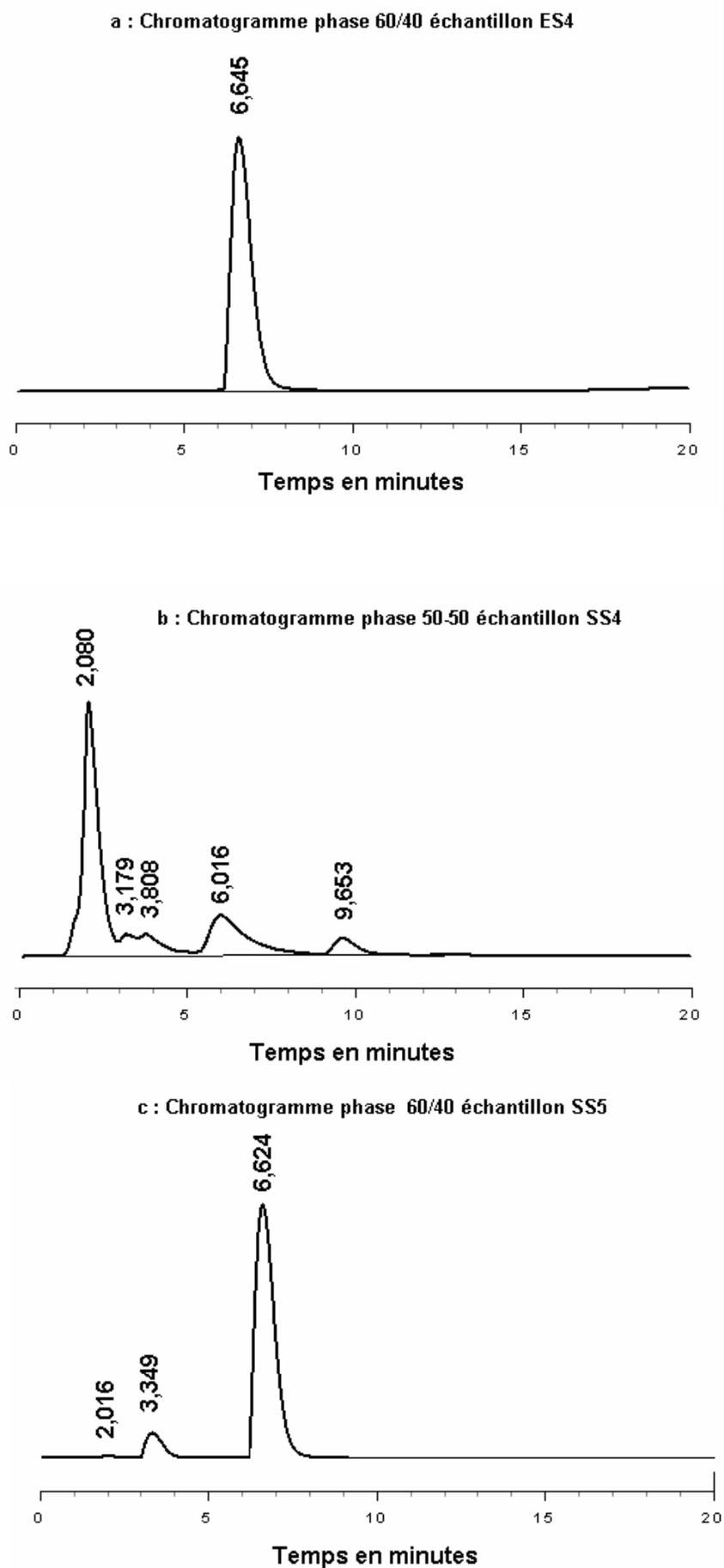


Figure N° 38 : Profils chromatographiques des extraits actifs des isolats ES4, SS4 et SS5.

notre cas, de liaisons dipôle-dipôle. La phase stationnaire inverse utilisée est composée de groupements octadéciles (C18) greffés sur un support de silice à l'intérieur d'une colonne.

L'échantillon est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu de la phase mobile polaire dans notre cas la phase mobile était constituée d'un mélange d'eau et de méthanol dont les rapports étaient ajustés à 40%/60% pour les extraits des isolats **ES4** et **SS5** et 50%/50% pour les extraits de l'isolat **SS4**.

Le profil chromatographique correspondant à une injection de 25 µl, montre pour l'extrait actif de l'isolat **ES4** un seul pic à 6,645 minutes a été obtenu, ce qui nous permet de conclure que l'extrait de l'isolat **ES4** contient au moins une espèce moléculaire (une seule substance bioactive). Pour l'isolat **SS4** la **figure n° 38b** révèle la présence de 5 pics différents, le premier correspond à 2,080 minutes suivi d'un autre pic à 3,179 minute, un troisième pic à 3,808 minutes, suivi d'un autre pic à 6,016 minutes et le dernier pic à 9,653 minutes, donc il y a présence d'au moins 5 molécules différentes dans les extraits de l'isolat **SS4**. En fin pour l'isolat **SS5** trois pics ont été obtenus, le premier correspond à 2,016 minutes suivie d'un autre pic à 3,349 minute et le troisième à 6,624 minutes, ce qui nous permet de conclure qu'il y a présence d'au moins 3 molécules différentes dans les extraits de l'isolat **SS5**.

2-6 Stabilité de l'activité antibactérienne

Dans le tableau n° 35 sont présentés les résultats de l'activité antibactérienne des extraits actifs maintenus à différentes températures, exposés à la lumière et à l'obscurité et congelés. Cette activité est mise en évidence, par la technique des disques, contre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

La **figure n° 39** montre que l'activité antibactérienne des extraits actifs est réduite de 50 % à 100%, respectivement, après traitement à une température de 50°C et de 70°C et 100°C. En revanche, la congélation à -18°C des extraits actifs et leur exposition à la lumière comme à l'obscurité n'entraîne pas une différence significative sur l'activité antibactérienne

Tableau n° 35 : Activité des extraits des isolats ES4, SS4 et SS5 après différents traitements contre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Extraits des isolats	Diamètres des zones d'inhibition après différents traitements des extraits					
	50°C	70°C	100°C	Lumière	Obscurité	Congélation
Extrait chloroformique de ES4	9	6	6	13,2	14	14,2
Extrait chloroformique de SS4	11,8	6	6	14	12,7	13
Extrait isoamyl acétatique de SS5	8	6	6	13,7	14	13,5

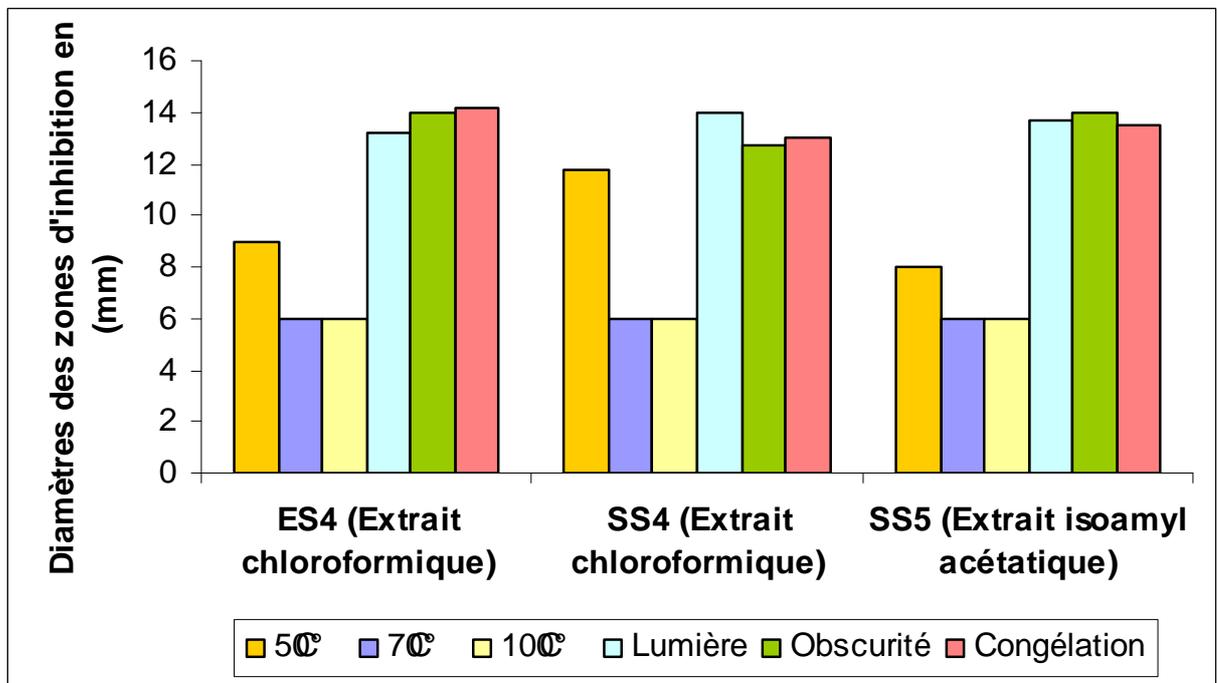


Figure N° 39 : Activité des extraits organiques des isolats ES4, SS4 et SS5 contre *St. aureus* ATCC 29213 après différents traitements.

Conclusion et Perspectives

Conclusion générale et Perspectives

Les objectifs essentiels de ce travail étaient la mise en évidence de la présence des actinomycètes dans les écosystèmes où les conditions physicochimiques (aridité, salinité, forte pollution...) sont extrêmes et de sélectionner des souches à activité antibactérienne.

Ainsi, plusieurs points ont été abordés :

1- L'isolement de ces bactéries à partir des échantillons provenant de ces écosystèmes a été réalisé par un protocole étudié et mis au point par nos soins afin de récupérer un maximum d'espèces actinomycétales viables et cultivables. Ce protocole adopté s'est avéré très efficace pour l'isolement des actinomycètes dits rares présents en faible quantité dans les différents écosystèmes et qui ne peuvent être isolés par les méthodes courantes utilisées en microbiologie. Leur sélection doit passer par l'élimination des microorganismes envahissants qui gênent leur croissance. **45** souches d'actinomycètes ont été ainsi isolées et purifiées, **24** souches de l'ensemble soit **53,33 %** proviennent des échantillons tellurique (le sol de Djebel el-ouahch et le sol de sebkha) **10** souches soit **22,22 %** des écorces d'arbres et **11** souches soit **24,44 %** des échantillons d'eau. La présence d'un nombre élevé d'actinomycètes dans les prélèvements de sols et d'écorces d'arbres est en accord avec les données bibliographiques qui laissent apparaître le sol comme le principal réservoir d'actinomycètes.

2- La diversité des actinomycètes isolés et l'identification de quelques souches représentatives productrices d'antibiotiques ont été établies par une approche taxonomique moléculaire. La diversité phylogénétique des souches actinomycétales isolées a été établie par la PCR universelle. Les fragments d'ADNr 16S de 479pb par amplification de la région ciblée du gène *rrn* qui code pour l'ARNr ont été obtenus à l'aide des amorces 91E et 16S₂. L'analyse des séquences de ces fragments a permis de classer les isolats dans le phylum des *Actinobacteria*, la classe V des *Actinobacteridae* et l'ordre I des *Actinomycetales* et sont réparties sur trois genres différents, *Streptomyces* et *Actinomadura* qui font partie du sous ordre des *Streptomycineae* et le genre *Nocardia* qui fait partie du sous ordre des *Corynebacterineae*. **93,33 %** des isolats appartiennent au genre *Streptomyces*, **4,44 %** au genre *Nocardia* et **2,22 %** au genre *Actinomadura*. Ces résultats confirment l'abondance des *Streptomyces* dans les écosystèmes telluriques par rapport aux autres genres d'actinomycètes.

3- Afin de sélectionner les souches productrices de métabolites antibactériens, différents milieux de culture pour la production d'antibiotiques (**Bennett** et **GLM**) ont été utilisés et différentes techniques (Technique des cylindres d'Agar et technique des puits) pour mettre en évidence leur pouvoir inhibiteur. Sur les **45** souches

d'actinomycètes isolées et purifiées, seules **17** souches (**37,78 %**) sont actives sur au moins une des bactéries-tests étudiées. Parmi les souches actinomycétales possédant une activité antibactérienne, seules deux souches (**4,44 %**) ont présenté une activité vis à vis des champignons testés.

4- Trois souches représentatives (**ES4**, **SS4** et **SS5**) isolées de l'eau et du sol de sebkha ont fait l'objet d'identification au niveau de l'espèce selon la méthode préconisée par l'International *Streptomyces* Project, par l'analyse chimique de la paroi et enfin par l'analyse moléculaire et phylogénétique. La culture des trois souches **ES4**, **SS4** et **SS5** est typique aux bactéries appartenant à la classe des *Actinobacteria*, et l'ordre des *Actinomycetales*. La surface des colonies de la souche **ES4** est poudreuse de texture semblable à celle de la peau de chamois de couleur grise, et de bord frangé. L'envers des colonies est gris à brun. Elle ne produit aucun pigment diffusible. La souche **SS4**, forme des colonies aplaties de 2 à 3 mm de diamètre d'aspect pâteux et de couleur jaune. Les colonies ressemblent à du cuir avec une surface froissée et poudreuse. La couleur des colonies est dans les temps gris, brun à jaune que l'on peut voir aussi bien à la surface qu'à l'envers de celles-ci. Après maturation, la masse sporale est de couleur variable en fonction du milieu de culture. Un pigment brun diffusible est sécrété par la souche dans tous les milieux de culture utilisés. La souche **SS5** se développe sous forme de colonies opaques bosselées compactées d'aspect corné très sèche. Sur le milieu sporulation agar elle présente des sillons radiaires. Le mycélium de substrat est abondant, bien développé de couleur beige à jaune claire, le pigment est non diffusible. Le mycélium aérien est absent dans les milieux ISP3, ISP4 et le milieu de Czapeck- Dox agar. Après maturation, la masse sporale est de couleur crème. Les parois cellulaires des souches **ES4** et **SS4** contiennent de l'acide LL-diaminopimélique et de la glycine, indiquant qu'elles possèdent le type de paroi I (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**). Les hydrolysats cellulaires contiennent principalement le galactose et le glucose mais aucun sucre caractéristique. Ainsi, les données chimiotaxonomique et phénotypiques nous permettent d'assigner les souches **ES4** et **SS4** au genre *Streptomyces*. Pour l'isolat **SS5** L'analyse chimiotaxonomique a révélé une paroi de type III avec la présence du méso-DAP et comme sucre caractéristique le madurose. La souche **SS5** a montrée une combinaison de caractères morphologiques et chimiotaxonomiques typique des bactéries du genre *Actinomadura*.

Les séquences du gène ARNr 16S pour les souches **ES4**, **SS4** et **SS5** ont été alignées à l'aide du logiciel **clustalw 1,6** avec les séquences des espèces représentatives des genres *Streptomyces* et *Actinomadura* disponibles au niveau des bases de données

(GenBank, EMBL et DDBJ) en utilisant le programme Blast (Altschul *et al.*, 1997). L'analyse phylogénétique basée sur un ensemble de plus de **1378 pb** ainsi que les séquences de **120** nucléotides de la région hypervariable γ du gène 16S rDNA (région discriminante pour les espèces du genre *Streptomyces*) nous a permis d'assigner l'isolat **SS4** au groupe de *Streptomyces anulatus* et *S. caviscabies* et l'isolat **SS5** à *Actinomadura meyerii* d'une part et de confirmer l'originalité de l'isolat **ES4** qui représentent probablement une nouvelle espèce du genre *Streptomyces* d'autre part.

L'approche polyphasique c'est-à-dire la combinaison des techniques moléculaires avec les tests morphologiques et biochimiques nous a permis de clarifier la position phylogénétique et d'identifier les isolats **SS4** et **SS5**. Elle nous a permis d'assigner la souche **SS4** à *S. setonii* avec laquelle elle partageait beaucoup de caractères phénotypiques, biochimiques et physiologiques et de confirmer l'originalité de l'isolat **SS5** qui représente probablement une nouvelle espèce du genre *Actinomadura*.

5- L'extraction par différents solvants organiques, la séparation des molécules bioactives par chromatographie sur papier, l'étude spectrale des antibactériens extraits par spectrophotométrie UV-Visible et HPLC montrent que le chloroforme était le solvant de choix pour l'extraction des molécules élaborées par les isolats **ES4** et **SS4**, tandis que l'isoamyl acétate l'était pour les substances élaborées par l'isolat **SS5**. Les extraits actifs obtenus à partir des cultures des souches **ES4** et **SS4** montrent un seul spot chacun en chromatographie sur papier, ils sont affiliés à la classe de la **streptomycine** selon **Betina (1965)**, ils présentent **un et cinq pics** en **CLHP** respectivement. L'extrait actif obtenu de la culture de l'isolat **SS5** montre également un seul spot, il est assigné à la classe de l'**illudine** d'après la classification de **Betina (1965)**, il possède **trois pics** en **CLHP**. Les spectres UV-Visible montrent l'absence des pics caractéristiques des polyènes pour tous les extraits actifs, nous pouvons donc conclure que les molécules produites par les souches **ES4**, **SS4** et **SS5** **sont de structure non polyénique**.

6- L'étude de la stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de plusieurs paramètres fait ressortir que l'activité des extraits organiques est réduite de 50 % à 100%, respectivement, après traitement à une température de 50° C et de 70° C et 100° C. En revanche, la congélation à -18° C des extraits actifs et leur exposition à la lumière comme à l'obscurité n'entraîne pas une différence significative sur cette activité.

Les approches culturales de cette étude nous ont permis d'accéder à une diversité phylogénétique des actinomycètes dans les écosystèmes étudiés et les études physico-chimiques préliminaires des biomolécules actives laissent envisager la possibilité de

découvrir des molécules à intérêt pharmaceutique. Pour que cette étude soit complète, deux points essentiels devront être approfondis :

1- Des études de diversité moléculaire pratiquées directement sur échantillon devront être réalisées par des techniques moléculaires d'écologie microbienne qui sont pour l'heure essentiellement basées sur l'utilisation des séquences d'ARN ribosomiques dans un but d'identification des microorganismes d'un environnement.

L'utilisation d'oligonucléotides plus spécifiques (par exemple d'un ordre ou d'un genre) permettrait de suivre plus précisément certaines populations d'actinomyètes au sein d'une communauté. Ces oligonucléotides peuvent être utilisés dans le cadre de différentes techniques moléculaires :

La RT-PCR permettant la détection de population métaboliquement actives, la PCR quantitative permettant de quantifier les populations, le FISH (CARD-FISH : Catalyzed Reporter Deposition coupled with Fluorescence *In Situ* Hybridization) utilisable pour la détection, le dénombrement et la détermination de la morphologie de certains microorganismes, la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) qui a été développée au début des années 1990. Cette technique est basée sur la séparation d'un mélange d'ADN double-brin de même taille (ex ou e.g. : ADNr 16S amplifiés par PCR), dans un gel de polyacrylamide par action simultanée de la chaleur et d'un gradient linéaire de dénaturant (urée, formamide). Chaque bande, ayant une mobilité propre, peut correspondre à une espèce ou à un groupe d'espèces taxonomiquement proches ou non, la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) consiste à séparer par électrophorèse des fragments en appliquant un gradient de température fixe et constant tout au long de la migration (plutôt qu'un gradient de dénaturant chimique dans le cas de la DGGE) (Muyzer, 1999 ; Muyzer and Smalla 1998), la TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) est une variante impliquant une dénaturation des fragments, non pas grâce à un gradient spatial de dénaturants chimiques, mais grâce à une augmentation temporelle et linéaire de la température au cours de la migration. Ces méthodes impliquent une séparation directe et physique des brins d'ADN. Elles permettent de traiter plusieurs échantillons simultanément, et d'accéder de manière rapide à des informations phylogénétiques par rapport à la méthode de clonage, beaucoup plus longue et fastidieuse.

La DGGE et la TTGE sont actuellement des méthodes de choix en microbiologie environnementale, particulièrement adaptées pour le suivi de la dynamique de populations microbiennes. Elles ont été utilisées pour étudier la diversité génétique de communautés microbiennes environnementales telles que les biofilms (Muyzer *et al.*,

1993), les sols (Kowalchuk *et al.*, 1998), le milieu océanique profond (Teske *et al.*, 1996), les sources chaudes terrestres (Ferris *et al.*, 1996), des peintures murales biodégradées (Pinar *et al.*, 2001), des produits alimentaires fermentés (Ampe *et al.*, 1999). Deux revues complètes concernant la DGGE et la TGGE ont été publiées (Muyzer *et al.*, 1997, Muyzer and Smalla, 1998).

La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) est une autre technique appropriée pour effectuer des suivis de populations. Elle peut être employée en écologie microbienne pour analyser le polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simple brin, notamment l'ADNr 16S. Après amplification par PCR d'une région variable du gène, une étape de dénaturation permet d'obtenir des ADN simples brins qui sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. Les ADN simples brins sont le siège d'interactions intra-moléculaires qui influencent, avec la masse moléculaire, la mobilité électrophorétique.

Ainsi, la diversité microbienne d'un échantillon est représentée par un ensemble de bandes, détectées comme un profil de pics ou chaque pic correspond à une séquence distincte. L'aire de chaque pic donne une information relative (après PCR) sur l'abondance du microorganisme correspondant dans l'échantillon. La migration de fragments préalablement clonés et séquencés permet d'identifier les bandes d'un profil complexe. Cette technique a notamment été utilisée pour l'analyse de la diversité microbienne au sein de digesteurs anaérobie ou d'échantillons de sol (Leclerc *et al.*, 2001 ; Stach *et al.*, 2001).

2- Etude structurale et identification complète des métabolites antibactériens produits par l'utilisation des techniques différentes notamment les spectres RMN ainsi que l'utilisation des méthodes d'analyses des substances bioactives qui doivent répondre à de nombreuses exigences: une grande sensibilité et surtout une très importante sélectivité. Cette sélectivité est généralement difficile à obtenir au moyen des méthodes classiques, ce qui engendre des procédures longues, complexes, et généralement spécifiques à quelques substances. De plus, des impératifs de plus en plus sévères au sujet des performances des méthodes analytiques et l'interprétation des résultats. L'analyse de ses métabolites par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) offre alors des perspectives particulièrement intéressantes dans ce domaine d'activité. Cette technique peut être utilisée selon plusieurs modalités: de manière qualitative ou semi-quantitative comme méthode de dépistage ou en tant que confirmation d'une méthode classique; ou alors de manière quantitative comme méthode à part entière. Cette méthode comporte une étape d'ionisation à pression

Conclusion et perspectives

atmosphérique qui peut se faire soit en phase liquide par source electrospray (ESI) soit en phase vapeur par ionisation chimique en utilisant un nébuliseur chauffé (APCI) ou une source photospray (APPI) en fonction de la polarité des molécules produites. A l'aide d'une détection quadripolaire simple ou en tandem (LC-MS, LC-MS/MS). Ces deux techniques sont devenues des compléments idéaux à la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), notamment pour la détection des substances plus polaires, thermolabiles et/ou actives à faible dose.

Bibliographie

Références bibliographiques

- **Acar J. F. and Francoual S.**, (1990). The clinical problems of bacterial resistance to the new quinolones. *J. Antimicrob Chemother.* **26 Suppl B**:207-13.
- **Adachi, T. and Morimoto S.** (2002). Clarithromycin and new derivatives of erythromycin. In **Kirst H. and Schönfeld W.** (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 53-72.
- **Alain K., Zbinden M., Le Bris N., Lesongeur F., Quérellou J., Gaill F. and Cambon-Bonavita M.-A.**, (2004). Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Env. Microbiol.* **6**, 227–241.
- **Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- **Amann R. I., Ludwig W. and Schleifer K.-H.**, (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- **Ampe F., Ben Omar N., Moizan C., Wachter C. and Guyot J. P.**, (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5464-5473.
- **Anderson J. S., Matsushashi M., Haskin M. A. and Strominger J. L.**, (1965). Lipid-phosphoacetylmuramyl-pentapeptide and lipid-phosphodisaccharide-pentapeptide: presumed membrane transport intermediates in cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**:881-889.
- **Anderson J. S., Matsushashi M., Haskin M. A. and Strominger J. L.**, (1967). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Phospholipid carriers in the reaction sequence. *J. Biol. Chem.* **242**:3180-3190.
- **Anderson A. S. and Wellington E. M. H.**, (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 797-814.
- **Auckland C., Teare L., Cooke F., Kaufmann M. E., Warner M., Jones G., Bamford K., Ayles H. and Johnson A. P.**, (2002). Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **50** : 743–6
- **Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K. H. and Beaulieu C.**, (2002). Characterization of rhizospheric soil *Streptomyces* from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 49-54.
- **Bartmann K. and Tarbuc R.**, (1980). "In vitro" activity of fosfomycin against *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria* species. *Infect.* **8**:217-218.

- **Becker B., Lechevalier M. P. and Lechevalier H. A.,** (1965). Chemical composition of cell-wall preparation from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13, 236 – 243.
- **Beker B., Lechevalier M. P., Gordon R. E. and Lechevalier H. A.,** (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 12, 421 – 423.
- **Berdy J.,** (1974). Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.*, **18**, 309-406.
- **Betina V.,** (1965). Paper chromatography of antibiotics. In “chromatographic reviews. Progress in chromatography, electrophoresis and related methods.” Lederer M. Ed. Pp121-166.
- **Blazquez J., Baquero M. R., Canton R., Alos I. and Baquero F.,** (1993). Characterization of a new TEM-type beta-lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(10): 2059-2063.
- **Bockle B., Galunsky B. and Muller R.,** (1995). Characterisation of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DMS 40530. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3705-3710.
- **Bollinger O.,** (1877). Ueber eine neue Pilzkrankheit beim Rinde. *Centralbl. f. med. Wissenschf.*, **15**, 481-485. Paper presented May 16, 1877 before Gesellschf. f. Morph. u. Physiol. zu Muinchen. In *The nomenclature of the Actinomycetaceae.* Breed R. S. and Conn H. J. (1919). *J. Bacteriol.* 585-602.
- **Boone C. J. and Pine L.,** (1968). Rapid method for characterization of actinomycetes by cell wall composition. *Appl. Microbiol.*, 16, 279 – 284.
- **Botto R. E., and Coxon B.,** (1983). Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy of neomycin B and related aminoglycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **105**:1021–1028.
- **Bouchek-Mechiche K., Gardan L., Normand P. and Jouan B.,** (2000). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 91-99.
- **Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A. et Boiron P.,** (2005). Isolation and molecular identification of actinomycete flora, of some saharien soils of south east Algeria (Biskra, El-Oued and Ouargla) study of antifungal activity of isolated strains. *J. Myc. Méd.* **15**, 39-44.
- **Bowden G. H. and Goodfellow M.,** (1990). The actinomycetes: *Actinomyces, Nocardia* and related genera, in : Topley and wilson’s principles of bacteriology, virology and immunity. Eighth edition. Vol. 2, systematic bacteriology. (M. T. Parker and B. I. Duerden) (pp. 31 – 57). Edward Arnold, Chichester..

- **Brenner D. J., Staley J. T. and Krieg N. R.,** (2001). Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. Boone DR, Castenholz RW (Eds.), Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg, Volume 1, pp.27-48.
- **Bressolier P., Letourneau F., Urdaci M. and Verneuil B.,** (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2570-2576.
- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. et Vobis G.,** Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In *Biotechnologie des antibiotiques*. **Larpent J. P. et Sanglier J. J.**, (1989), pp 32-61 ; Masson. Paris.
- **Bryskier A.,** (1999a). Lincosamines. In **Bryskier A.,** (Ed.), *Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques*, Ellipses, Paris, pp. 616-632.
- **Bryskier A.,** (1999b). Streptogramines. In **Bryskier A.,** (Ed.), *Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques*, Ellipses, Paris, pp. 595-615.
- **Bryskier A., Agouridas C., and Gasc J. C.,** (1993). Classification of macrolide antibiotics. In **Bryskier A., Butzler J. P., Neu H. C., and Tulkens P. M.,** (Eds.), *Macrolides : chemistry, pharmacology and clinical uses*, arnette blackwell, Paris, pp. 5-66.
- **Busscher G. F., Rutjes F. P., van Delft F. L.,** (2005). 2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics, *Chem. Rev.*, **105**, 775-791.
- **Calamita H. G. and Doyle R. J.,** (2002). Regulation of autolysins in teichuronic acid-containing *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Microbiol.* **44**, 601-606.
- **Canu A. and Leclercq R.,** (2001). Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition: the case of streptogramins. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.*, **1**, 215-225.
- **Carbon C. and Bax R.,** (1998). Education and debate Regulating the use of antibiotics in the community. *BMJ* **317**:663-665.
- **Carter A. P., W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly and V. Ramakrishnan** (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**:340-348.
- **Cassidy P. J. and Kahan F. M.,** (1973). A stable phosphoenolpyruvate intermediate in the synthesis of uridine-5-diphospho-N-acetyl-2-amino-2-deoxyglucose-3-enolpyruvylether. *Bioch.* **12**:1364-1374.
- **Cavalla M. et Eberlinberlin T.,** (1994). Isolement des streptomycetes du sol. *L'opéron*, **XIX**, 13-17.
- **Centers for Disease Control and Prevention,** (1997). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptbility to vancomycine-United States. *Morbid Mortal Weekly Rep.* **46**:765-76.

- **Centers for Disease Control and Prevention**, (2004). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, *Am. J. Infect. Control.* **32**:470-85.
- **Chitte R. R., Nalawade V. K. and Dey S.**, (1999). Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Let. Appl. Microbiol.* **28**, 131-136.
- **Chitte R. R. and Dey S.**, (2000). Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. *Let. Appl. Microbiol.* **31**, 405-410.
- **Chormonova N. T. and Preobrazhenskaya T. P.**, (1981). Occurrence of *Actinomadura* in Kazakhstan soils. *Antibiotiki* **26**, 341-345.
- **Christensen B. G., Leanza W. J., Beattie T. R., Patchett A. A., Arison B. H., Ormond R. E., Kuehl F. A., Alberts-Schonberg Jr., G., and Jardetzky0.**, (1969). Phosphonomycin: structure and synthesis. *Sci.***166**:123-124.
- **Chun J. and Goodfellow M.**, (1995). A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 240-245.
- **Chun J., Blackall L. L., Kang S., Hah Y. C. and Goodfellow M.**, (1997). A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. Nov., comb. Nov. *Int. J. Syst. Bact.* **47**, 127-131.
- **Chun J., Seong C. N., Bae K. S., Lee K. J., Kang S. O., Goodfellow M. and Hah Y. C.**, (1998). *Nocardia flavorosea* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bact.* **48**, 901-905.
- **Chun J., Youn H.-D., Yim Y.-I., Lee H., Kim M. Y., Hah Y.C. and Kang S.O.**, (1997). *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int. J. syst. Bact.*, **47**, 492-498.
- **Colwell R. R.**, (1970). Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*: Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. *J. Bacteriol.* **104**(1): 410-433.
- **Conn H. J.**, (1917). Soil flora studies. V. Actinomycetes in soil. N. Y. Agr. Exp. Sta., Tech. Bul. 60, 25 pp. Abstract in Jour. Bact., 2, 149-154, 1917. *In* The nomenclature of the *Actinomycetaceae*. Beed R. S. and Conn H. J. (1919). *J. Bacteriol.* 585-602.
- **Cox E. C., White J. R. and Flaks J. G.**, (1964). Streptomycin action and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **51**:703-709.
- **Crawford D. I., Lynch J. M., Whipps J. M. and Ousley M. A.**, (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3899-3905.
- **Cross T.**, (1981). Aquatic actinomycetes : a critical survey of the occurrence growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 397-410.
- **Cross T.**, (1989). The actinomycetes II. Growth and examination of actinomycetes – some guidelines. *In* **Williams S. T., SHARPE M. E. and HOLT J. G.**, (1989).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. **Williams & Wilkins**. Baltimore. p 2340 – 2343.

- **Davies J. and Davis B. D.**, (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem*, **243**:3312-3316.

- **Davies J. E.**, (1964). Studies on the ribosomes of streptomycin-sensitive and resistant strains of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**:659-664.

- **Davies J., Gorini L. and Davis B. D.**, (1965). Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.* **1**:93-106.

- **Davis B. D.**, (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* **51**:341-350.

- **Davis B. D., Chen L. L. and Tai P. C.**, (1986). Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:6164-6168.

- **Delhomme C.**, (1974). Production d'un nouvel antibiotique par une souche de *Streptomyces*. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle, Clermont-ferand . p. 90.

- **Demain A. L. and Solomon N. A.**, (1985). Biology of industrial micro-organisms. The Benjamin/ cummings publishing company, INC. California.

- **Doering-Saad C., Kämpfer P., Manulis S., Kritzman G., Schneider J., Zakrzewska-Czerwinska J., Schrempf H. and Barash I.**, (1992). Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. *Appl. Environ.l Microbiol.* **58**: 3932-3940.

- **Duggar B. M.**, (1948). Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann N Y Acad Sci* **51**, 177–181.

- **EARSS**, (2002). Management team, members of the advisory board and national representatives of EARSS. EARSS annual report 2002: ongoing surveillance of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium* and *E. faecalis*. www.earss.rivm.nl.

- **Embley T. M., and Stackbrandt E.**, (1994). The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:257–289.

- **Ensign J. C.**, 1978. Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**,185 – 219.

- **Ensign J. C., Normand P., Burden J. P. and Yallop C. A.**, (1993). Physiology of some actinomycete genera. *Res. Microbiol.* **144**, 657-660.

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

- **Fernandez-Munoz R., Monro R.E., Torres-Pinedo R., and Vazquez D.**, (1971). Substrate- and antibiotic-binding sites at the peptidyl-transferase centre of *Escherichia coli* ribosomes. Studies on the chloramphenicol. lincomycin and erythromycin sites. *Eur. J. Biochem.* **23**, 185-193.

- **Ferris M. J., Muyzer G. and Ward, D. M.,** (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined population inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol* **62**, 340-346.
- **Finlay A. C., Hobby G. L., P'an S. Y., Regna P. P., Routien J. B., Seeley D. B., Shull G. M., Sobin B. A., Solomons I. A., Vinson J. W. and Kane J. H.,** (1950). Terramycin, a new antibiotic. *Sci.* **111**, 85.
- **Fitch W. M. and Margoliash E.,** (1967). Construction of phylogenetic trees: a method based on mutation distances as estimated from cytochrome *c* sequences is of general applicability. *Sci.* **155**, 279–284.
- **Floyd M. H., Pieper R. L. and Mertz F. P.,** (1987). Sporulation of *Streptomyces roseosporus* in submerged culture. *J. Ind. Microbiol.* **2**, 235 – 241.
- **Forsgren, A. and Walder M.,** (1983). Antimicrobial activity of fosfomycin "in vitro." *J. Antimicrob. Chemother.* **11**:467-471.
- **Friedman C. S., Beaman B. L., Chun J., Goodfellow M., Gee A. and Hedrick R. P.,** (1998). *Nocardia crassostreae* sp. Nov., the causal agent of nocardiosis in pacific oysters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 237-246.
- **Galantenko O. A., Terekhova L. P. and Preobrazhenskaya T. P.,** (1981). New *Actinomadura* species isolated from Turkmen soil samples and their antagonistic properties. *Antibiotiki* **26**, 803–807.
- **Gazenko S. V., Reponen T. A., Grinshpun S. A. and Willeke K.,** (1998). Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4410 – 4415.
- **Genné D., Siegrist H. H.,** (2003). De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Med Suisse.* **20**; 464-468.
- **George R. C., Ball L. C., and Norbury P. B.,** (1990). Susceptibility to ciprofloxacin of nosocomial gram-negative bacteria and staphylococci isolated in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **26 Suppl F**:145–156.
- **Ghuysen J. M.,** (1968). Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* **32**, 425-464.
- **Ghuysen J. M.,** (1997). Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: Facts, doubts and hopes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **8**, 45-60.
- **Ghuysen J. M., Charlier, P., Coyette, J., Duez, C., Fonze, E., Fraipont, C., Goffin, C., Joris, B. and Nguyen-Disteche, M.,** (1996). Penicillin and beyond: Evolution, protein fold, multimodular polypeptides, and multiprotein complexes. *Microbial Drug Resist.* **2**, 163-175.
- **Ghuysen J. M., Frère J. M., Leyh-Bouille M., Nguyen-Distèche M., Coyette J., Dusart J., Joris B., Duez C., Dideberg O., Charlier P., Dive G. and Lamotte-**

Brasseur J., (1984). Bacterial wall peptidoglycan, DDpeptidas and beta-lactam antibiotics. *Scand. J. Infect. Dis.* **42**, 17-37.

- **Gladek A., Mordarski M., Goodfellow M. and Williams S. T.**, (1985) Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**: 175-180.

- **Gonzalez-Toril E., Llobet-Brossa E., Casamayor E. O., Amann R. and Amils R.**, (2003). Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4853-4865.

- **Goodfellow M., and Simpson K. E.**, (1987). Ecology of streptomycetes. *Front. Appl. Microbiol.* **2**: 97-125.

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

- **Goodfellow M., Lacey J. and Todd C.**, (1987). Numerical classification of thermophilic streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 3135-3149.

- **Goodfellow M., Ferguson E. V. and Sanglier J.J.**, (1992). Numerical classification and identification of *Streptomyces* species – a review. *Gene* **115**: 225-233.

- **Gordon R. E. and Smith M. M.**, (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.*, **66**, 41-48.

- **Gottlieb D. and Shirling E. B.**, (1976). “An evaluation of the international streptomycetes project”. In : Actinomycetes, the boundary microorganisms. *Arai T. Ed., Tokyo.* 1-8.

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

- **Goyer C., Faucher E. and Beaulieu C.**, (1996). *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from Deep- Pitted Lesions in Potatoes in Quebec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(3). 635-639.

- **Green D. W.**, (2002). The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin. Ther. Targets* **6**, 1-19.

- **Haansuu J. P.**, (2002). Demethyl (C-11) cezomycin a novel calcimycin antibiotic from the symbiotic, N₂ fixing actinomycete Frankia. Academic Dissertation in General Microbiology. Helsinki..

- **Hain T., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. and Rainey F. A.**, (1997). Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 202-206.

- **Han Q., Zhao Q., Fish S., Simonsen K. B., Vourloumis D., Froelich J. M., Wall D., Hermann T.**, (2005). Molecular recognition by glycoside pseudo base pairs and triples in an apramycin-RNA complex. *Angewandte Chem. Int. Edition* **44**(18), 2694-2700.

- **Hancock R. E. W.**, (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* **27 (suppl. 1):** S93-9.
- **Harz C. O.**, (1879). *Actinomyces bovis*, ein neuer Schimmel in den Geweben des Rindes. Deutsche Zeitschr. f. Tiermed., Supple. to Bd. 5 (Jahresber. d. k. Central-Tierarznei Schule in Munchen for 1877-78), 125-140. In The nomenclature of the *Actinomycetaceae*. Beed R. S. and Conn H. J. (1919). *J. Bacteriol.* 585-602.
- **Hasegawa T., Takizawa M. and Tanida S.**, (1983). A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29, 319 – 322.
- **Healy F. G. and Lambert D. H.**, (1991). Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 479-482.
- **Hendlin D., Stapley E. O., Jackson M., Wallick H., Miller A. K., Wolf F. J., Miller T. W., Chaiet L., Kahan F. M., Foltz E. L., Woodruff H. B., Mata J. M., Hernandez S. and Mochales S.**, (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomycetes. *Sci.* **3**:166(901):122–123.
- **Henssen A.**, (1957). Beiträge zu'r Morphologie and Systematik der thermophilen Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* **26**, 373–414.
- **Herman T.**, (2005). Drugs targeting the ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15** (3):355-66.
- **Hernandez-Coronado M. J., Hernandez M. , Centenera F., Perez-Leblic M. I. , Ball A. S. and Arais M. E.**, (1997). Chemical characterization and spectroscopic analysis of the solubilization products from wheat straw produced by *Streptomyces* strains grown in solid-state fermentation. *Microbiol.*, **147**, p. 1359-1367.
- **Hiramatsua K, Hanaki H., Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC**, (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob Chemother.* **40**:135-46.
- **Hirvonen M.-R., Nevalainen A., Makkonen M., Monkkonen J. and Savolainen K.**, (1997). *Streptomyces* spores from moldy houses induce nitricoxide, TNF α and IL-6 secretion from RAW264.7 macrophage cell line without causing subsequent cell death. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **3**:57-63.
- **Hsu S. C. and Lockwood J. L.**, (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* 29, 422-426.
- **Hu H. and Ochi K.**, (2001). Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by including combined resistant mutations. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**,1885-1892.
- **Hwang B. K., Lim S. W., Kim B. S., Lee J. Y. and Moon S.S.**, (2001). Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**,3730-3745.

- **Iinuma S., Yokota A., Hasegawa T. and Kanamaru T.,** (1994). *Actinocorallia* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 230–234.
- **Iwai Y. and Takahashi Y.,** (1992). Selection of microbial sources of bioactive compounds, In: The search for bioactive compounds from microorganisms (**Omura S.**). *Springer-Verlag*, 281-302.
- **Jacque A.,** (1985). Contribution à l'étude des antifongiques : Recherche de nouvelles substances produites par les actinomycetales. Thèse doctorat d'état en pharmacie. Nancy I.
- **Jevons MP,** (1961). Celebin-resistant staphylococci. *BMJ* **1**:124-5.
- **Jukes T. H. and Cantor C. R.,** (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp. 21–132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- **Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J. and Kropp, H.** (1974). The mechanism of action of fosfomycin. *Ann. New York Acad. Sci.* **235**, 364–85.
- **Kämpfer P., Kroppenstedt RM. and Dott W.,** (1991). A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *J. Gen. Microbiol.* **137**,1831-1891.
- **Kandler O.,** (1970). Aminoacid sequence of murein and taxonomy of actinomycetes. *Int. J. Syst. Bact.,* 20, 419 – 507.
- **Kataoka M., Ueda K., Kudo T., Seki T. and Yoshida T.,** (1997). Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**: 249-255.
- **Katsifas E. A., Giannoutsou E. P. and Karagouni A. D.,** (1999). Diversity of streptomycetes among specific Greek terrestrial ecosystems. *Let. Appl. Microbiol.,* 29, 48-51.
- **Kaul M. and Pilch D. S.,** (2002). Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition: the binding of neomycin-class aminoglycosides to the A site of 16S rRNA. *Bioch.* **41**(24):7695-706.
- **Kim B., Sahin N., Minnikin D. E., Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M. and Goodfellow M.,** (1999) Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalkalitolerans* sp. nov. *Int. J. syst. Bacteriol.* **49**:7-17.
- **Kim D., Chun J., Sahin N., Hah Y. C. and Goodfellow M.,** (1996). Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S ribosomal DNA sequence comparisons. *Int. J. syst. Bacteriol* **46**: 581-587.
- **Kim S. B., Lee S. D., Kim S. Y., Oh H. M., Kang S. O. and Hab Y. C.,** (1996). Numerical classification of actinomycetes isolated from volcanic soil. *Jour. Microbiol.* **34**;2.105-116.

- **Kimura M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**,111-120.

- **Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H., Hamdiken H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A. and Boiron P., (2005).** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of north-east of Algeria. *J. Myc. Méd.* **15**;45-51.

- **Kondo S. and K. Hotta (1999).** Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: development and enzymatic modifications. *J. Infect. Chemother*, **5**:1-9.

- **Korn-Wendish F. and Schneider J., (1992).** Phage-typing - a useful tool in actinomycete systematics. *Gene* **115**: 243-247.

- **Kowalchuk G. A., Bodelier P. L. E., Heilig G. H. J., Stephen J. R. and Laanbroek H. J., (1998).** Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiol Ecol* **27**, 339-350.

- **Kraisky A., 1914.** Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur. Centralbl. Bakt., Abth. II, 41, 649-688. *In The nomenclature of the Actinomycetaceae.* Beed R. S. and Conn H. J. (1919). *J. Bacteriol.* 585-602.

- **Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. and Goodfellow M., (1990).** Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**,148-160.

- **Kruse W., 1896.** Systematik der Streptothricheen. In Fliigge's Die Mikroorganismen, Bd. 2, 48-66. *In The nomenclature of the Actinomycetaceae.* Beed R. S. and Conn H. J. (1919). *J. Bacteriol.* 585-602.

- **Kumar S., Tamura K. and Nei M., (2004)** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.* **5**:150-163.

- **Kuroya M., Ouchi N. and Katsuno M., (1949).** Studies on the antibiotic substances from *Actinomyces*. II. On the classification of antibiotic-producing *Actinomyces* by the "streak plate method". *J. Antibiotics* **2 (suppl. A)**: 74-78.

- **Kuster K., (1979).** The concept of gens and species within the *Actinomycetales* in: *Nocardia* and *Streptomyces*: *Gutar fisher Verlag.* 21-25.

- **Kuti J. L., Capitano B., Nicolau D. P. (2002).** Cost-effective approaches to the treatment of community-acquired pneumonia in the era of resistance. *Pharmacoeconomics.* **20**:513-28.

- **Kutzner K. J., (1986).** The family *Streptomycetaceae*. In: Starr MP, Stolp H, Tr_per HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, vol. 2, Springer-Verlag, New York, pp 2028-2090.

- **Labeda D. P.**, (1992). DNA-DNA hybridisation in the systematics of *Streptomyces*. *Gene* **115**: 249-253.
- **Labeda D. P. and Lyons A. J.**, (1992). DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 532-535.
- **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**:426-431.
- **Labro M.**, (2002). Cellular accumulation of macrolide antibiotics. Intracellular bioactivity. In **Kirst,H. and Schönfeld,W.** (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, *Basel-Boston-Berlin*, pp. 37-52.
- **Lacey J.**, (1997). Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.* **4**, 113-121.
- **Larpent J. P. et Larpent-Gourgaud M.**, (1985). Manuel pratique de microbiologie. *Herman. Paris*.
- **Larpent J. P. et Larpent-Gourgaud M.**, (1990). Memento technique de microbiologie. *Tec. & Doc. Lavoisier*.
- **Larpent J. P. et Sanglier J. J.**, (1989). Biotechnologie des antibiotiques. *Masson. Paris*.
- **Laurent F.J., Provost F., Boiron P.**, (1999) Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**:99-102.
- **Leadbetter J. R.**, (2003). Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol* **6**,274-281.
- **Lechevalier H. A., and Lechevalier M. P.**, (1981). Introduction to the order *Actinomycetales*. In : The prokaryotes, Vol. 2 (Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds.), *Springer – Verlag, Berlin*. p. 1915-1922.
- **Lechevalier M. P. and Lechevalier H. A.**, (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. Society for Industrial Microbiology. Arlington, Virginia. pp. 22–291. Edited by A. Dietz & D. W. Thayer. Arlington, VA: *Society for Industrial Microbiology*.
- **Lechevalier M. P. and Lechevalier H.**, (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. j. Syst. Bacteriol.* **20**, 435 – 443.
- **Lechevalier M. P. and Lechevalier H.**, (1985). “Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces*” in : Biology of industrial microorganisms. *The Benjamin Cummings Publishing Company, INC*. 315-360.
- **Lechevalier M. P.**, (1968). Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. *J. Labor. Clin. Med.* **71**, 934-944.
- **Lechevalier M. P., De Bievre C. and Lechevalier H. A.**, (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes : Phospholipid composition. *Bioch. Syst. Ecol.* **5**,249-260.

- **Lechevalier M. P., Horan A. C. and Lechevalier H.,** (1971). Lipid composition in the classification of *Nocardiae* and *Mycobacteria*. *J. Bact.*105, 313-318.
- **Leclerc H., Meyer A. et Deiana J.,** (1986). Cours de microbiologie générale. *Doin éditeurs. Paris*
- **Leclerc M., Delbes C., Moletta R. and Godon J.-J.,** (2001). Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiol Ecol* **34**, 213-220.
- **Leclercq R. et Coignard B.,** (2006). Les entérocoques résistants aux glycopeptides : situation en France en 2005. *BEH.* **13**:85-87.
- **Lee J. Y. and Hwang B. K.,** (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48**:407-17.
- **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**: 669–74.
- **Lindenfelser L. A., Shotwell O. L., Bachler M. J., Shannon G. M. and Pridham T. G.,** (1964). Antibiotics Against Plant Disease VIII. Screening for Nonpolyenic Antifungal Antibiotics Produced by Streptomycetes' *Appl. Microbiol.***12**,(6), 508-512.
- **Lo C. W., Lai N. S., Cheah H-Y, Wong N. K. I. and Ho C.C.,** (2002). Actinomycetes isolated from soil samples from the crocher range sabah. *Asean rev. biod. Environ. Cones.*1-7.
- **Locci R.,** (1976). “Developmental micromorphology of actinomycetes”. In : Actinomycetes, the boundary microorganisms. *Arai T. Ed., Tokyo.* 170-180.
- **Locci R. and Sharples G. P.,** (1984). Morphology. In : “The biology of actinomycetes”. (**Goodfellow M., Modarski M. and Williams S. T.,** Eds.) pp 165-199. *Ac. Press. London.*
- **Long P. F. and Wildman H. G.,** (1993). Strategy for the use of petreatments in the isolation of non-streptomycete actinomycetes from soil. *Actinomycetes.* 4, 59-64.
- **Lopes A., Coelho R. R, Meirelles M. N. I., Branquinha M. H., and Vermelho A. B.,** (1999). Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*: Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Men. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro.* 94, 763-770.
- **Lu Z., Wang L., Zhang Y., Shi Y., Liu Z., Quintana E. T. and Goodfellow M.,** (2003). Two new species of *Actinomadura*: *Actinomadura catellatispora* sp. nov. and *Actinomadura glauciflava* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **53**, 137–142.
- **Mariat F. et Sebald M.,** (1990). « Les actinomycetes. » Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. *Flammarion. France.*

- **Marmur J. and Doty P. (1962)**. Determination of the base composition of desoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **5**, 109-118.
- **Mata J. M., Rodriguez A. and Gallego A., (1977)**. Fosfomycin: "in vitro" activity. *Chemotherapy* **23(Suppl. 1)**:23-24.
- **Mazodier J., (1974)**. Sociétés industrielles et déchets solides. *Science et vie.* **106**, 109-115.
- **McBride M. J. and Ensign J. C., (1986)**. Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.* **169(11)**: 4995-5001.
- **McNeil M. M. and Brown J. M., (1994)**. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 357-417.
- **Mingeot-Leclercq M. P., Y. Glupczynski and P. M. Tulkens (1999)**. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**:727-737.
- **Moore B. S., Trischman J. A., Seng D., Kho D., Jensen P. R. and Fenical W. S., (1999)**. Antiinflammatory Depsipeptides from a marine *Streptomyces*. *J. Org. Chem.* **64**, 1145-1150.
- **Mordaski L., (1983)**. Degradation of lignin-related aromatic compounds by *Nocardia*. *Appl. Microbiol.*, **26**, 176 - 184.
- **Muyzer G., (1999)**. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**, 3217-322.
- **Muyzer G. and Smalla K., (1998)**. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- **Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H. and Wawer C., (1997)**. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology, In A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 1-27.
- **Muyzer G., De Waal E. C. and Uitterlinden A. G., (1993)**. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.
- **Nelson K. E., Clayton R. A., Gill S. R., Gwinn M. L., Dodson R. J., Haft D. H., Hickey E. K., Peterson L. D., Nelson W. C., Ketchum K. A., McDonald L., Utterback T. R., Malek J. A., Linher K. D., Garrett M. M., Stewart A. M., Cotton M. D., Pratt M. S., Phillips C. A., Richardson D., Heidelberg J., Sutton G. G., Fleischmann R. D., Eisen J. A., White O., Salzberg S. L., Smith H. O., Venter J. C. and Fraser C. M., (1999)**. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nat.* **399**, 323-329. detection,

identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**, 45-54.

- **Ochi K.**, (1995). A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by analysis of ribosomal protein AT-L30. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 507-514.

- **Ochi K., Mijadoh S. and Tamura T.**, (1991). Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of ribosomal protein AT-L30 as a novel approach to actinomycete taxonomy: application to the genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 243-239.

- **O'Donnel A. G., Minnikin D. E. and Goodfellow M.**, (1985). Integrated lipid and wall analysis of actinomycetes. In "Chemical methods in bacterial systematics" (**Goodfellow M. and Minnikin D. E.**, Coord.) pp 131-143. *Ac. Press., London*.

- **O'Donnel A. G., Minnikin D. E., Goodfellow M. and Parlett J. H.**, (1982). The analysis of actinomycetes wall aminoacids by gas chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 75-78.

- **Okami Y. and Hotta K.**, (1988). Search and discovery of new antibiotic in: **M. Goodfellow**, S.T. Williams and M. Mordanski (eds) *Actinomycetes in biotechnology*. *Academic Press, London*. pp. 33 – 67.

- **Okami Y. and Okazaki T.**, (1978). Actinomycetes in marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**, 145-152.

- **Omoto S., Shomura T., Suzuki H. and Inouye S.**, (1979). Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. II. Isolation, structure and biological properties of N-carbamoyl-D-glucosamine (substance SF-1993). *J. Antibiotics.* **32**: 436-441.

- **Omura S.**, (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. *Springer, Verlag, New York*.

- **Ottow J. C. G. and Glathe H.**, (1968). Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* **16**, 170 – 171.

- **Ouhdouch Y.**, (1989). Bactéries actinomycetales rares productrices d'antifongiques. Criblage, sélection et étude taxonomique d'une souche active. Purification de l'antifongique élaboré. Thèse de l'université de Nancy I.

- **Pace N. R.**, (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Sci.* **276**, 734-740.

- **Pape T., W. Wintermeyer and M. V. Rodnina** (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat. Struct. Biol.* **7**:104-107.

- **Pereyre S.**, (2003). Mécanismes responsables de la résistance naturelle et acquise aux macrolides et apparentés chez *Mycoplasma hominis* et de la résistance acquise à ces antibiotiques chez *Mycoplasma pneumoniae*. 208p. Thèse; Sciences Biologiques et Médicales Option Biologie-Santé ; Bordeaux ; n°2003BOR21066

- **Petrosyan P., Gartia-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitron C. and Flores M. E.,** (2003). *Streptomyces mexicanus* ep. Nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int. J. Sys. Budevo. Microbiol.* 53, p. 269 – 273.
- **Pinar G., Saiz Jimenez C., Schabereiter Gurtner C., Blanco Varela M. T., Lubitz W. and Rolleke S.,** (2001). Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Ecol* **37**, 45-54.
- **Pine L.,** (1970). Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. *Int. J. Bacteriol.* 20, 445-474.
- **Poschner J., Kroppenstedt R. M., Fischer A. and Stackebrandt E.,** (1985). DNA:DNA reassociation and chemotaxonomic studies on *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Micropolyspora* and *Nocardopsis*. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 264–270.
- **Pochon J. et Tradieux P.,** (1962). Techniques d'analyses en microbiologie du sol. *Edition de la tourelle, St Mandé.* pp. 110-111.
- **Poly M. C., Greland C., Martin D., Lumley L., Denis F.,** (1998). First clinical isolate of vancomycin intermediated *Staphylococcus aureus* in French hospital. *Lancet* ; **351** : 1212.
- **Preud'homme J., Belloc A. C. Y., et Tarridec P.,** (1965). Un antibiotique formé de deux groupes de composants à synergie d'action : la pristinamycine. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **260**, 1309-1312.
- **Price K. E. and Godfrey J. C.,** (1974). Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. *Adv. Appl. Microbiol.* **18**:191-307.
- **Pridham T. G. and Gottlieb D.,** (1948). The utilization of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. *J. Bacteriol.*, 56,107 – 114.
- **Pridham T. G. and Lyons A. J.,** (1976). "Polyenic antifungal antibiotics: systematics of producers." In : Actinomycetes, the boundary microorganisms. *Arai T. Ed., Tokyo.* 373-544.
- **Pridham T. G., Anderson P., Foley C., Lindenfesler L. A., Hessestine C. W. and Benedict R. G.,** (1956-1957). A selection of media for maintenance and taxonomie study of Streptomyces. *Antibiotics Ann.* 1956-1957 :947-953.
- **Provost F., Laurent F., Camachouz categeri L. R., Boiron P.** (1997). Molecular study of persistence of *Nocardia asteroides* and *Nocardia otitidiscaviarum* strains in patients with long-term nocardiosis. *J. Clin. Microbiol*; **35**:1157-60.
- **Ramakrishnan Nagarajan,** (1991). Antibacterial Activities and Modes of Action of Vancomycin and Related Glycopeptides, *Antimicrob. Agents Chemoth.* **35**;4,605-609.

- **Relman D. A., Loutit J. S., Schmidt T. M., Falkow S., Tompkins L. S.,** (1990). The agent of bacillary angiomatosis an approach to the identification of uncultured pathogen. *N. Engl. J. Med.* 327 : 293-301.
- **Reponen T. A., Gazenko S. V., Grinshpun S. A., Willeke K. and Cole E. C.,** (1998). Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 64,3807 – 3812.
- **Reynolds P. E.,** (1989). Structure, biochemistry and mode of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**:943-950.
- **Ridell M., Wallerström G. and Williams S. T.,** (1986). Immunodiffusion analysis of phonetically defined strains of *Streptomyces*, *Streptoverticillium* and *Nocardia*. *Syst. Appl. Microbiol.* **8**: 24-27.
- **Ritter T. K. and Wong C. H.,** (2001). Carbohydrate-based antibiotics: a new approach to tackling the problem of resistance. *Angew Chem Int Ed*, **40**:3508-3533.
- **Rodier J.,** (1984). L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux industrielles, eaux de mer. 7^{ème} édition. Dunod.
- **Rodnina M. V. and Wintermeyer W.,** (2001). Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends Biochem Sci*, **26**:124-130.
- **Rogers L. and Becker I.,** (1980). Chemical composition of cell-wall preparation from various genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 13, 236 – 243.
- **Rohrer S. and Berger-Bachi B.,** (2003). FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 837-846.
- **Rossello Mora R. and Amann R.,** (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 39-67.
- **Sadowsky M. J., Kinkel L. L., Bowers J. H. and Schottel J. L.,** (1996). Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3489-3493.
- **Saitou N. and Nei M.,** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- **Salas J. A. and Hardisson C.,** (1981). Sugar uptake during germination of *Streptomyces antibioticus* spores. *J. Gen. Microbiol.* 125, 25-31.
- **Sanchez L. and Barana A. F.,** (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 142, 1209-1220.
- **Sanglier J. J. et Trujillo M.,** (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de selection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 12, (13) pages?.

- **Sanglier J. J., Huck T. A. and Fehr T.,** (1993). Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.* **144**, 633-642.
- **Schaal K. P.,** (1983). Laboratory diagnosis of actinomycetes diseases, in: The biology of the actinomycetes. 5M. **Goodfellow, M. Mordarski and S. T. Williams**) (pp. 425 – 456). *Academic Press, London, New York.*
- **Shirling E. B. and Gottlieb D.,** (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bact.,* **16**, 313-340.
- **Shomura T., Yoshiba J., Amano S., Kojima M., Inouye S. and Niida T.,** (1979). Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1193. *J. Ant., XXXII*, 428-435.
- **Silvey J. K. G. and Roach A. N.,** (1975). The taste and odor producing aquatic actinomycetes. *Crit. Rev. Environ. Control.* **5**, 233-273.
- **Slee AM, Wuonola MA, McRipley RJ, Zajac I, Zawada MJ, Bartholomew PT, Gregory WA. and Forbes M.,** (1987). Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agents Chemother.* **31(11)**:1791-7.
- **Smati, F., H. Laouar, F. Khalifa, C. Bentchouala, A. Hacini, et A. Lezzar.** 1994. Résistance à la pénicilline G de *Streptococcus pneumoniae* responsable d'infections graves communautaires en Algérie. *Med. Mal. Infect.* **24**:1190-1192.
- **Smeyers Y. G., Hernandez A. and Von Carstenn-Lichterfelde C.,** (1983). Quantum mechanical calculations useful for determining the mechanism of action of fosfomycin. *J. Pharm. Sci.* **72**:1011-1014.
- **Smeyers Y. G., Hernandez A., Romero F. J., Fernandez M., Galvez E. and Arias S.,** (1987). Self consistent field-molecular orbital (SCF-MO) calculations and nuclear magnetic resonance measurements for fosfomycin and related compounds. *J. Pharm. Sci.* **76**:753-756.
- **Spangler S. K., Jacobs M. R. and Appelbaum P. C.,** (1994). Susceptibilities of 177 penicillin-susceptible and -resistant pneumococci to FK 037, cefpirome, cefepime, ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, imipenem, biapenem, meropenem, and vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:898-900.
- **Spickler C., Brunelle M.-N. and Brakier-Gingras L.,** (1997). Streptomycin binds to the decoding center of 16S ribosomal RNA. *J Mol Biol,* **273**:586-599.
- **Stach, J. E. M., Bathe, S., Clapp, J. P. & Burns, R. G. (2001).** PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 139-151.
- **Stackebrandt E.,** (2003). The richness of prokaryotic diversity: there must be a species somewhere. *Food technol Biotechnol* **41**: 17-22.

- **Stackebrandt E., and Goebel B. M.**, (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol* **44**, 846-849.
- **Stackebrandt E., Liesack W. and Witt D.**, (1992). Ribosomal RNA and rDNA sequence analysis. *Gene* **115**: 255-260.
- **Stackebrandt E., and Kandler O.**, (1979). Taxonomy of the genus *Cellulomonas*, based on phylogenetic characters and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**:273-282.
- **Stackebrandt E., Lewis B. J. and Woese C. R.**, (1980). The phylogenetic structure of the coryneform group of bacteria. *Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig. C 2* : 137-149.
- **Stackebrandt E., Rainey F. A. and Ward-Rainey N. L.**, (1997). Proposal for new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classic nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47** ; 2, 479-491.
- **Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P., Kampfer, P., Maiden, M., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. and Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1043-1047.
- **Staneck J. L. and Roberts G. D.**, (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.*, **28**, 226 – 231.
- **Stapley E. O., Hendlin D., Mata J. M., Jackson M., Wallick H., Hernandez S., Mochales S., Currie S. A., and Miller R. M.**, (1970). Phosphonomycin. I. Discovery and in vitro biological characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1969**. 284-290.
- **Steingrube V. A., Wilson R. W., Brown B. A., Jost Jr. K. C., Blacklock Z., Gibson J. L. and Wallace Jr. R. J.**, (1997). Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 817-822.
- **Sutcliffe J. A.** (2003). Antibacterial agents : Solutions for the evolving problems of resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **13** : 4159-61.
- **Swaney S. M., Aoki H., Ganoza M. C. and Shinabarger D. L.**, (1998). The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**(12):3251-5.
- **Taguchi S., Kojima S., Terabe M., Kumazawa Y., Kohriyama H., Suzuki M., Miura K. I. and Momose H.**, (1997) Molecular phylogenetic characterisation of *Streptomyces* protease inhibitor family. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 542-551.
- **Takeuchi T., Sawada H., Tanaka F. and Matsuda I.**, (1996). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 476-479.

- **Teske A., Wawer C., Muyzer G. and Ramsing N. B.**, (1996). Distribution of sulfate-reducing *Bacteria* in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number count and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1405-1415.
- **Tipper D. and Strominger J. L.**, (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1133-1141.
- **Tortorano A. M., Cabrini E. et Viviani M. A.**, (1979). Sensibilité in vitro des levures à cinq antifongiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.*, **8**, 69-74.
- **Tresner H. D., Hayes J. S. and Backus E. J.**, (1968). Differential tolerance of Streptomyces to sodium chloride as a taxonomic tool. *Appl. Microbiol.* **16** : 1134-1136.
- **Trujillo M. E. and Goodfellow M.**, (1997). Polyphasic taxonomic study of clinically significant actinomadurae including the description of *Actinomadura latina* sp. nov. *Zbl. Bakt.* **285**, 212–233.
- **Trujillo M. E. and Goodfellow M.**, (2003). Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**, 39–68.
- **Trystram D., Varon E., Péan Y., Grundmann H., Gutmann L., Jarlier V. et Aubry-Damon H.**, (2004). Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARSS) : résultats 2002, place de la France. *BEH* ; 32-33 ; 142-144.
- **Van Heijenoort J.**, (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**, 25R-36R.
- **Von Carstenn-Lichterfelde C., Fernandez M., Galvez E. et Bellanato J.**, (1983). Structural study of fosfomycin ((-)-cis-1,2-epoxypropylphosphonic acid) salts and related compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1983**:943-947.
- **Waksman S. A. and Curtis R. E.**, (1916). The Actinomycetes of the soil. *Soil Sci.*, **1**, 99-134. In *The nomenclature of the Actinomycetaceae*. Beed R. S. and Conn H. J. (1919). *J. Bacteriol.* 585-602.
- **Waksman S. A.**, (1963). *Ma vie avec les microbes*. Albin Michel Ed. p. 280.
- **Walsh C.**, (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. **406** ; 775-81.
- **Wang Y., Zhang Z., Ruan J., Wang Y. and Ali S.**, (1999). Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **23**, 178–187.
- **Ward, J. and Curtis, C. A.**, (1982). The biosynthesis and linkage of teichuronic acid to peptidoglycan in *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.* **122**, 125-132.

- **Watson E. T. and Williams S. T.**, (1974). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII Actinomycetes in coastal sand belt. *Soil Biol. Biochem.*, **6**, 43-52.
- **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., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. and Trüper, H. G.** (1987). Report from the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463-464.
- **Wellington E. M. H., Stackebrandt E., Sanders D., Wolstrup J., Jorgensen N. O. G.**, (1992). Taxonomic status of *Kitasatosporia* and proposed unification with *Streptomyces* on the basis of phenotypic and 16S rRNA analysis and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943AL. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 156-160.
- **Williams S. T. and Cross T.**, (1971). "Actinomycetes." In : Methods in microbiology. *Booth C. Ed., Academic Press, London.* **4**, 295-334.
- **Williams S. T., Lanning S. and Wellington E. M. H.**, (1993). Ecology of actinomycetes. In: The biology of actinomycetes . **M. Goodfellow *et al.***, eds. *Academic press, London*, pp. 481 - 528.
- **Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kuznetsov V. D., Le Monnier F. J., Long P. F., Maycroft K. A., Palma R. A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J. I. and West M.**, (1993). detection and identification of novel actinomycetes. *Pres. Microbiol.* **144**, p. 653 – 656.
- **Williams S. T., Sharples G. P. and Bradshaw R. M.**, (1973). The fine structure of *Actinomycetales*, p. 113-130. In : **Sykes G. and Skinner F. A.** (ed). *Actinomycetales* : Characteristics and practical importance. *Academic Press. Inc., New York, N. Y.*
- **Williams S.T., Sharpe M. E., and Holt J. G.**, (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.4. Williams & Wilkins. Baltimore. U.S.A.
- **Williams S. T., Goodfellow M., Wellington E. M. H., Vickers J. C., Alderson G., Sneath P. H. A., Sackin M. J. and Mortimer A. M.**, (1983) A probability matrix for identification of some streptomycetes. *J. Gen.l Microbiol.* **129**: 1815-1830.
- **Witt D., and Stackebrandt E.**, (1990). Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943, 339AL. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**: 361-371.
- **Woese C. R.**, (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- **Woese C. R. and Fox G. E.**, (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5088-5090.
- **Woese C. R., Kandler O., and Wheelis M. L.**, (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4576-4579.
- **Woese, C. R., Achenbach, L., Rouviere, P. and Mandelco, L.** (1991). Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**, 364-371.

- **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 rot disease in *Porphyra* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2666-2675.
- **Woodcock J., D. Moazed, M. Cannon, J. Davies and H. F. Noller** (1991). Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.*, **10**:3099-3103.
- **Wright G. D., Berghuis A. M. and Mobashery S.,** (1998). Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance, p. 27-69. Dans *Resolving the antibiotic paradox: progress in understanding drug resistance and development of new antibiotics*. B. P. Rosen and S. Mobashery (ed.). Plenum Press, New York.
- **Wright J. H.,** (1905). The biology of the microorganism of Actinomycosis. *Jour. Med. Research*, **13**, 349-404. In *The nomenclature of the Actinomycetaceae*. Beed R. S. and Conn H. J. (1919). *J. Bacteriol.* 585-602.
- **Wu R.-Y. and Chen M. H.,** (1995). Identification of the *Streptomyces* strain KS3-5. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **36**, 201-205.
- **Xu L.-H., Li Q. R. and Jiang C. L.,** (1996). Diversity of soil actinomycetes in yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 244 - 248.
- **Zahn J. A., Higgs R. E. and Helton M. D.,** (2001). Use of direct-infusion electrospray mass spectrometry to guide empirical development of improved conditions for expression of secondary metabolites from actinomycetes. *App. Env. Microbiol.* **67**(1) 377-386.
- **Zhang Z., Wang Y. and Ruan J.,** (1997). A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai and Tanaka 1982). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 1048-1054.
- **Zhang Z. S., Wang Y. and Ruan J. S.,** (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 411-422.
- **Zhang Z., Kudo T., Nakajima Y. and Wang Y.,** (2001). Clarification of the relationship between the members of the family *Thermomonosporaceae* on the basis of 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequences and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 373-383.
- **Zimmerman S. B., Stapley E. O., Wallick H. and Baldwin R.,** (1970). Phosphonomycin. IV. Susceptibility testing method and survey. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1969**. 303-309.

Annexe

Milieux de culture

- **Gélose à l'extrait de levure-Extrait de Malt (GLM)**

Extrait de levure	3 g
Extrait de Malt	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

- **Milieu Sporulation agar**

Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
Tryptose	2 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	Traces
Glucose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

- **Milieu Glucose-Asparagine**

Glucose	10 g
L-asparagine	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,8

- **Milieu Mueller-Hinton**

Infusion de viande	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g

pH = 7,4

- **Milieu Casitone**

Casitone	9 g
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Citrate de sodium	10 g
Na ₂ HPO ₄	3,34 g
KH ₂ PO ₄	0,54 g
Agar	18 g
Eau distillée	1000 ml

- **Milieu YMA**

Yeast nitrogen base	6,5 g
Asparagine	1,5 g
Glucose	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

- **Milieu de Bennett**

D-Glucose anhydre	10 g
Casaminoacides	2 g
Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

PH = 7,3

- **Milieu AF**

Extrait de Malt	10 g
Extrait de levure	4 g
Glucose	2 g
NaCl	2,5 g
CaCO ₃	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0

- **Milieu GELM**

Extrait de Malt	10 g
Extrait de levure	4 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

- **Milieu SF**

Glycérol	25 g
Extrait de levure	10 g
Peptone	5 g
NaCl	2 g
CaCO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0

- **Milieu NPH**

Extrait de Malt	2 g
Extrait de levure	4 g
Glucose	4 g
NaCl	0,5 g
CaCO ₃	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,0	

- **Milieu GBA**

Glycérol	20 g
Amidon soluble	20 g
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
CaCO ₃	3 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,0	

- **Milieu ISP 1**

Tryptone	5g
Extrait de levure	3g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 7,0 – 7,1	

- **Milieu ISP 2**

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
D-Glucose	4g
Agar	20g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 7,3	

- **Milieu ISP 3**

Solution d'avoine	1000 ml
Solution saline ¹	1 ml
pH = 7,2	

- **Milieu ISP 4**

Amidon soluble	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
CaCO ₃	2 g
Solution saline ¹	1 ml
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 7,0 – 7,4	

- **Milieu ISP 5**

Glycérol	10 g
L-asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Solution saline ¹	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 7,0 – 7,4	

- **Milieu ISP 6**

Peptone	15 g
Protéose peptone	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Thiosulfate de sodium	0,08 g
Extrait de levure	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,0	

- **Milieu ISP 7**

Glycérol	15 g
L-asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2-7,4	

- **Milieu ISP 9**

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄	5,65 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
Solution saline ²	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 6,8-7,0	

- **Milieu Czapek Dox Agar**

Saccharose	30g
NaNO ₃	3g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000 ml
PH = 7,3 – 7,5	

- **Milieu « nutritif Agar »**

« Nutrient broth » (Difco)	8 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 6,6 – 7,0	

- **Milieu Amidon-caséine-agar**

Amidon soluble	10 g
Caséine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7-7,5	

- **Milieu Glucose –extrait de levure-peptone (GLP)**

Glucose	3 g
Extrait de levure	5 g
Peptone	5 g
CaCO ₃	7,5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7	

- **Milieu de Hickey et Tresner**

Dextrine	10 g
Casamino acides	2 g
Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
CaCl ₂ . 6H ₂ O	20 mg
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,3	

- **Milieu de Hickey et Tresner**

Dextrine	10 g
Casamino acides	2 g
Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
CaCl ₂ . 6H ₂ O	20 mg
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,3	

Solution d'avoine :

Grains d'avoine pilés	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml

Faire bouillir pendant 20 min. Filtrer sur gaze et réajuster le volume à 1000 ml avec de l'eau d'eau distillée.

Solution saline¹ :

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Eau distillée qsp	100 ml

Solution saline² :

CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,15 g
Eau distillée	100 ml

N.B : L'ajustement des pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou une solution d'HCl 1N selon le cas.

Nom : **KITOUNI**
Prénom : **Mahmoud**

Date de soutenance
29 / 10 / 2007

Diplôme : **Doctorat d'Etat**

Intitulée :

**Isolement de bactéries actinomycétales
productrices d'antibiotiques
à partir d'écosystèmes extrêmes.
Identification moléculaire des souches actives et
caractérisation préliminaire des substances élaborées**

Résumé

45 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons d'eau, de sol et d'écorces d'arbres prélevés d'écosystèmes où les conditions physicochimiques (aridité, salinité, forte pollution...) sont extrêmes. L'activité antimicrobienne a été effectuée contre trois bactéries Gram positives, trois bactéries Gram négatives, trois levures et trois champignons filamenteux. Elle a été réalisée par la technique des cylindres d'agar. Parmi les 45 isolats 17 souches (**37,78 %**) ont montré une activité contre au moins une bactérie-tests étudiées. **Quatre vingt treize pour cent** des souches actives ont été identifiées par la PCR universelle comme étant appartenir au **genre *Streptomyces***, **4 %** au **genre *Nocardia*** et **2 %** au **genre *Actinomadura***. L'identification moléculaire des souches **ES4**, **SS4** et **SS5** nous a permis d'assigner la souche **SS4** à *S. setonii*, tandis que **ES4** et **SS4** elles représentent probablement de nouvelles espèces. L'extraction par différents solvants organiques, la séparation des molécules bioactives par chromatographie sur papier nous a permis de les classer dans la classe de la streptomycine et la classe de l'illudine. Les propriétés physicochimiques des antibactériens extraits ont été déterminées par l'étude spectrale par spectrophotométrie UV-Visible et HPLC. Ainsi que l'étude de la stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de plusieurs paramètres.

Mots clés : Actinomycètes, écosystèmes extrêmes, antibiotiques, phylogénie