

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



UNIVERSITE FRERES MENTOURI  
CONSTANTINE 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

N° d'ordre : 105/D3c/2021  
N° de série : 03/MicB/2021

**Thèse**  
Présentée pour l'obtention  
**Du Diplôme de Doctorat 3ème cycle**  
En Ecologie microbienne  
Par

**MEDJEMADJ Maissa**

*Thème :*

**Etude de la biodiversité des actinobactéries dans quelques eaux  
thermales de la région Est de l'Algérie**

**Soutenue le : 16/12/21**

**Membres de jury :**

<b>Président</b>	<b>Mr. BENHIZIA Yacine</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. KITOUNI Mahmoud</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. SILINI Allaoua</b>	<b>MCA</b>	<b>U. Ferhat Abbas Sétif</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. GRAMA Borhane Samir</b>	<b>MCA</b>	<b>U. Larbi Ben M'hidi – O.E.B</b>

**Année universitaire : 2020-2021**

## Remerciements

*Merci au bon dieu de m'avoir aidé à réaliser ce travail*

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'université Mentouri Constantine 1. Une partie des travaux a également été réalisée au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, département de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université de A Coruña, UDC. Corogne. Espagne).

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse Pr. BOUDEMAGH Allaoueddine, qui a supervisé mon travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de ma reconnaissance pour ses conseils, son humanisme, ses encouragements et son aide précieuse pour le bon déroulement de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury de thèse qui ont accepté avec amabilité d'évaluer mon travail,

Mr. BENHIZIA Yacine, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1.

Mr. KITOUNI Mahmoud, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1.

Mr. SILINI Allaoua, Maitre de conférences A à l'Université Ferhat Abbas à Sétif.

Mr. GRAMA Borhane Samir, Maitre de conférences A à l'Université Larbi Ben M'hidi à Oum El Bouaghi.

Que tous les membres trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir bien voulu être les évaluateurs de mon travail de thèse.

Ce travail est également le fruit d'une collaboration scientifique et n'aurait pu être réalisé sans la contribution des membres Professeurs et chercheurs du groupe Exprela María-Isabel González-Siso, María-Esperanza Cerdán et Juan-José Escuder-Rodríguez du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire- Université de A Coruña, UDC. Espagne. J'exprime mes sincères remerciements à toute l'équipe Exprela de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de m'avoir donné la possibilité de réaliser une grande partie de l'étude expérimentale de cette thèse dans de très bonnes conditions. Merci surtout pour votre grande hospitalité, disponibilité et soutien.

Je souhaite également remercier mes collègues Boukaous Leyla et Guendouze Assia pour leurs aides et générosité.

*Merci !*

## Dédicace

*A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation, à ma mère Nora symbole de fidélité, de patience et de bonté, en faible témoignage de mon incommensurable reconnaissance pour tous ses sacrifices... Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon très cher époux Soufiane, qui m'a accompagné tout au long de mon chemin, qui m'a encouragé et donner la force et la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés...*

*A mes très chers frères Naoufel et Menaf.*

*A mes défunts grands- parents Mohamed Tahar et Fatima.*

*Aux bonnes et mauvaises circonstances qui m'ont rendu meilleure.*

*A ceux que j'aime, et ceux qui m'aiment ... Je dédie ce travail.*

*Maya*

# Table des Matières

## LISTE DES TABLEAUX

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## Revue bibliographique

### Chapitre 1 : Les Actinobactéries

1-1 Généralités.....	6
1-2 Habitats.....	7
1-2-1 Environnement terrestre.....	7
1-2-2 Environnement aquatique.....	8
1-3 Biologie du développement.....	10
1-3-1 Caractéristiques morphologiques basiques des actinobactéries.....	12
1-3-1-1 Mycélium du Substrat.....	13
1-3-1-2 Mycélium aérien.....	14
1-3-1-3 Les spores.....	14
1-2-3 Mécanismes moléculaires de la différenciation morphologique .....	17
1-4 Taxonomie et critères d'identification des actinobactéries .....	18
1-4-1 Classification morphologique.....	20
1-4-2 Classification chimiotaxonomique.....	23
1-4-3 Classification moléculaire .....	29
1-4-3-1 Séquençage du gène ARNr16S et phylogénie.....	29
1-4-3-2 Hybridation ADN-ADN .....	30
1-4-3-3 Pourcentage G+C .....	31
1-4-4 Taxonomie polyphasique .....	32
1-4-5 Taxonomie numérique .....	33

### Chapitre 2 : Valorisation des actinobactéries thermo-tolérants et thermophiles

2-1 Définition.....	34
2-2 Caractéristiques .....	34

2-3 Physiologie .....	36
2-4 Systématique, taxonomie et phylogénie .....	37
2-5 Adaptation .....	38
2-6 Importance écologique .....	38
2-6-1 Compostage .....	38
2-6-2 Activité anti-microbienne .....	39
2-6-3 Promotion de la croissance des plantes .....	39
2-6-4 Fixation de l'azote .....	40
2-7 Applications .....	40
2-7-1 Synthèse de nanoparticules d'or .....	41
2-7-2 Bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures .....	42
2-7-3 Biolixiviation .....	43
2-7-4 Bioremédiation des sites contaminés par des radionucléides .....	43
2-7-5 Agent de contrôle biologique .....	44
2-7-6 Production de composés bioactifs .....	44
2-7-7 Synthèse d'autres composés pharmaceutiques .....	45
2-7-8 Enzymes importantes sur le plan industriel .....	48
2-7-8-1 Amylase .....	48
2-7-8-2 Protéases .....	49
2-7-8-3 Cellulases, xylanase et acétyl xylane estérase .....	49
2-7-8-4 Dextranase .....	50
2-7-8-5 Nitrile Hydratase .....	50
2-7-8-6 Laccase .....	51
2-7-8-7 Alginate Lyase .....	51
2-7-8-8 Alditol oxydase .....	51
2-7-8-9 Monoxyde de carbone déshydrogénase .....	52
2-7-8-10 Cutinase .....	52

### **Chapitre 3: Les eaux thermales en Algérie**

3-1 Définition .....	54
3-2 Classification .....	55
3-3 Les Stations thermales en Algérie .....	56
3-3-1 Région Algéroise .....	56

3-3-2 Région Est-Algérien .....	57
3-3-3 Région Ouest Algérien .....	60
3-3-4 Région Sud Algérienne .....	60

## Partie expérimentale

1- Échantillonnage des eaux thermales .....	62
2- Isolement sélectif, purification et conservation des isolats actinobactériens .....	62
3- Identification moléculaire des isolats actinobactériens .....	63
3-1 Lyse cellulaire .....	63
3-2 Amplification par PCR .....	63
3-3 Electrophorèse sur gel d'agarose .....	64
3-4 Séquençage du fragment d'ARNr 16S et analyse phylogénétique .....	64
4- Caractérisation des souches actinobactériennes sélectionnées .....	65
4-1 Préparation des inocula des actinobactéries sélectionnés .....	65
4-1-1 inoculum général .....	65
4-1-2 Préparation de la biomasse bactérienne .....	65
4-2 Caractérisation morphologiques par microscope électronique .....	65
4-3 Caractérisation physiologique .....	66
4-3-1 La croissance à différentes températures .....	66
4-3-2 La croissance à différents pH .....	66
4-3-3 Tolérance au chlorure de sodium .....	66
4-3-4 Croissance en présence des lysozymes .....	67
4-3-5 Croissance en présence d'antibiotiques .....	67
4-4 Caractérisation métabolique par les Galeries Api .....	67
4-5 Caractérisation chimiotaxonomique .....	68
4-5-1 L'acide diaminopimélique (DAP) .....	68
4-5-2 Caractérisation des sucres de la paroi .....	68
4-5-3 Caractérisation des lipides polaires, des acides gras et des ménaquinones .....	68
4-6 Détermination du G+C % .....	70
4-6-1 Extraction de l'ADN génomique .....	70
4-6-2 Estimation du G+C% .....	71
4-7 Criblage de l'activité enzymatique .....	71
4-7-1- Lipase .....	71

4-7-2 Cellulase et xylanase .....	71
4-7-3 Protéase .....	71
4-8 Criblage de l'activité antimicrobienne .....	72
4-8-1 Recherche de l'activité antibactérienne .....	72
4-8-1-1 Inocula des bactéries-tests .....	72
4-8-1-2 Techniques des cylindres d'agar .....	72
4-8-2 Recherche de l'activité antifongique .....	73

## Résultats et discussion

1- Isolement .....	74
2- Identification moléculaire des isolats par séquençage du gène de l'ARNr 16S .....	78
3- Caractérisation des isolats sélectionnés .....	83
3-1 Observation des souches en microscopie électronique .....	84
3-2 Caractérisation physiologique .....	86
3-3 Caractérisation métabolique .....	90
3-4 Caractérisation chimiotaxonomique des parois cellulaires bactérienne .....	92
3-4-1 Analyse de l'acide diaminopimélique (DAP) .....	92
3-4-2 Profil des sucres .....	92
3-4-3 Profil phospholipidique .....	92
3-4-4 Analyse des ménaquinones .....	93
3-4-5 Analyse des acides gras .....	93
3-5 Détermination du G+C % .....	95
3-6 Criblage de l'activité enzymatique .....	96
3-7 Criblage de l'activité antimicrobienne .....	99
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>106</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>110</b>
<b>Annexes</b>	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Différents types des composants de la paroi cellulaire des actinobactéries (Lechevalier et Lechevalier, 1970) .....	26
<b>Tableau 2:</b> Marqueurs taxonomiques utilisés pour différencier les genres d'actinobactéries (Barka <i>et al.</i> , 2016) .....	27
<b>Tableau 3:</b> Espèces actinobactériennes thermophiles et thermotolérantes (Shivlata et Satyanarayana, 2015) .....	35
<b>Tableau 4:</b> Composés bioactifs produits par les actinobactéries thermophiles .....	45
<b>Tableau 5:</b> Composés et enzymes à valeur pharmaceutique produits par des actinobactéries thermophiles et alcalophiles .....	47
<b>Tableau 6:</b> Enzymes commerciales produites par des actinobactéries thermophiles et alcalophiles .....	53
<b>Tableau 7:</b> Description des sites d'échantillonnage, nombre et pourcentage d'isolats obtenu par site et par températures d'incubation .....	76
<b>Tableau 8 :</b> Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries par séquençage du gène ARNr 16S .....	79
<b>Tableau 9 :</b> Caractéristiques physiologique des isolats H, J, K et N4 .....	87
<b>Tableau 10:</b> Etude chimiotaxonomique des isolats sélectionnés .....	94
<b>Tableau 11:</b> Valeurs des températures de fusion et de la teneur en G+C de l'ADN génomique des quatre souches sélectionnées .....	95
<b>Tableau 12:</b> Résultats du criblage enzymatique des isolats sélectionnés .....	96
<b>Tableau 13 :</b> Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries vis-à-vis des microorganismes testés .....	101



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Représentation schématique du cycle de vie des actinobactéries sporulantes (Barka <i>et al.</i> , 2016) .....	12
<b>Figure 2.</b> Colonie d'actinobactérie poussant sur gélose (Qinyuan <i>et al.</i> , 2016) .....	13
<b>Figure 3.</b> (A) La fragmentation du mycélium de substrat et la véritable ramification de <i>Nocardia asteroides</i> . (B) <i>Actinosynnema mirum</i> IFO 14064T. (C) <i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> NBRC 16177T. (Qinyuan <i>et al.</i> ,2016).....	14
<b>Figure 4.</b> Caractéristiques morphologiques des spores (Qinyuan <i>et al.</i> ., 2016) .....	17
<b>Figure 5.</b> Les types de flagellation (Qinyuan <i>et al.</i> ., 2016) .....	17
<b>Figure 6.</b> Croissance apicale chez <i>Streptomyces</i> (Flärdh, 2003) .....	18
<b>Figure 7.</b> Taxonomie proposée pour les actinobactéries dans Bergey Manual de bactériologie systématique (Ludwig <i>et al.</i> , 2012; Gao et Gupta ., 2012) .....	19
<b>Figure 8.</b> Ordres de la classe <i>Actinobacteria</i> basées sur l'analyse les gènes de l'ARNr 16S. (Goodfellow <i>et al.</i> , 2012 in Bergey's Manual, 2012) .....	20
<b>Figure 9.</b> Différents types de chaînes de spores produites par les actinobactéries (Barka <i>et al.</i> , 2016) .....	22
<b>Figure 10.</b> Phylogramme indiquant l'emplacement et la parenté de certaines souches d'actinobactéries thermophiles et thermotolérantes appartenant à quatre classes ( <i>Actinobacteria</i> , <i>Acidimicrobiia</i> , <i>Rubroacteria</i> et <i>Thermoleophilia</i> ) du phylum <i>Actinobacteria</i> (Shivlata et Satyanarayana, 2015) .....	37
<b>Figure 11.</b> Applications industrielles potentielles des actinobactéries thermophiles et alcalophiles industrielles .....	41
<b>Figure 12.</b> Application d'enzymes importantes produites par des actinobactéries thermophiles et alcalophiles .....	48
<b>Figure 13.</b> Répartition géographique des sources chaudes algériennes étudiées .....	62
<b>Figure 14.</b> Aspects macroscopiques des isolats H, N3, C2 et J isolés à partir des sources chaudes.....	74

<b>Figure 15.</b> Aspect microscopique des isolats d'actinobactéries après coloration de Gram .....	75
<b>Figure 16.</b> L'arbre phylogénétique construit à l'aide du logiciel MEGA 5 (Tamura <i>et al.</i> ,2011) selon la méthode des distances (Neighbor-Joinning) (Saitou et Nei, 1987) montrant les relations phylogénétiques des séquences de gènes d'ARNr 16S amplifiées des isolats d'actinobactéries avec des séquences des souches types des espèces appartenant aux genres <i>Streptomyces</i> , <i>Rhodococcus</i> et <i>Rathayibacter</i> étroitement apparentées de la base de données EzBioCloud .....	80
<b>Figures 17.</b> Isolats d'actinobactéries sélectionnés (H, J, K, N4) .....	84
<b>Figure 18.</b> Microscopie électronique à balayage (MEB) des 4 isolats d'actinobactéries sélectionnées .....	85
<b>Figure 19.</b> Croissance des isolats sélectionnés en présence des lysozymes .....	89
<b>Figure 20.</b> Croissances des isolats sélectionnés à 50°C .....	89
<b>Figure 21.</b> Croissance des isolats en présence de différentes concentrations de NaCl .....	89
<b>Figure 22.</b> Séparation des isomères DL-DAP des hydrolysats des isolats sélectionnés par chromatographie sur couche mince .....	93
<b>Figure 23.</b> Séparation des sucres des cellules entières des hydrolysats des isolats sélectionnés par chromatographie sur couche mince .....	93
<b>Figure 24.</b> Séparation des lipides polaire des hydrolysats des isolats actinobactéries H et N4 par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice .....	94
<b>Figure 25.</b> Activité xylanolytique des isolats d'actinobactéries H,J,K et N4 sur milieu de culture LB additionné de substrat chromogène insolubles (AZCL-Xylane ) montrant les zones d'hydrolyses bleuâtres autour des colonies .....	97
<b>Figure 26.</b> Activité cellulolytique des isolats d'actinobactéries H, J, K et N4 sur milieu de culture LB additionné de substrat chromogène insolubles (AZCL-Cellulose ) montrant les zones d'hydrolyses bleuâtres autour des colonies .....	97
<b>Figure 27.</b> Activité lipolytique des isolats d'actinobactéries H, J, K et N4 sur milieu de culture LB additionné de tributyrine montrant les halos clairs autours des colonies .....	97

<b>Figure 28.</b> Activité antibactérienne des isolats H, J, K et N4 vis-à-vis des bactéries à Gram-positif .....	102
<b>Figure 29.</b> Activité antibactérienne des isolats H, J, K et N4 vis-à-vis des bactéries à Gram-négatif .....	102
<b>Figure 30.</b> Activité antibactérienne des isolats H, J, K et N4 vis-à-vis des champignons filamenteux .....	102
<b>Figure 31.</b> Activité antibactérienne de l'isolat J vis-à-vis de <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) par la technique des cylindres d'agar .....	103
<b>Figure 32.</b> Activité antifongique des isolats N4, H et K vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum</i> et <i>Aspergillus niger</i> par la technique des cylindres d'agar .....	103

## LISTE DES ABREVIATIONS

- PGP:** Plant Growth Promotion
- CTP:** Cytidine Triphosphate
- PCD:** Mort cellulaire programmée
- DAP :** Acide-diaminopimélique
- NMA:** Acide nocardiomycologique
- DDH:** DNA-DNA Hybridization
- Tm:** Température de fusion
- GC%:** Pourcentage de la guanine et la cytosine.
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- MLSA:** Analyses de séquence multilocus
- ANI:** Identité nucléotidique moyenne
- PES:** Poly succinate d'éthylène
- PCL:** Poly  $\epsilon$ -caprolactone
- PHB:** Poly hydroxybutyrate D-3
- PTMH:** Poly succinate de tétraméthylène
- PLA:** Poly L-lactide
- DPP-IV:** Dipeptidyl peptidase-4
- XDAP:** X-prolyldipeptidyl aminopeptidase
- GLP-1:** Protéine 1 de type glucagon
- VD3:** Vitamine D3
- NAD:** Nicotinamide Adénine Dinucléotide
- AldO:** Alditol oxydase thermostable
- CO:** Monoxyde de carbone
- dNTPs:** Désoxyribo Nucléotides Tri Phosphates
- DMSO:** Diméthylsulfoxyde
- TAE :** Tris Acétate EDTA
- BET:** Bromure d'éthidium

**rpm:** Rotation par minute

**UV:** lumière ultraviolette

**SAI:** Servizos de Apoio á Investigación

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**BLAST:** Basic SearchToolAlignment

**MEGA 5:** Molecular Evolutionary Genetics Analysis

**MEB:** Microscopie électronique à balayage

**MIS:** Microbial Identification System

**HPLC:** High-performance liquid chromatography

**OTU:** Unité Taxonomique Opérationnelle

**DO:** Densité optique

**$\beta$ -NAG:** N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase

**GTA:** glycyl-tryptophane-arylamidase

**L:** Lipide

**GL:** Glycolipide

**PL:** Phospholipide

**PI:** Phosphatidylinositol

**PG:** Phosphatidylglycerol

**PE:** Phosphatidylethanolamine

**PGL:** Phosphoglycolipide

**DPG:** Diphosphatidylglycerol

## ملخص

تم استكشاف وجود و التنوع البيولوجي للاكتينوبكتيريا في الينابيع الساخنة المتواجدة في الجزائر. و ذلك بتحليل عينات مياه أربعة ينابيع ساخنة في شمال شرق الجزائر. تم عزل و تحديد 23 سلالة مختلفة شكليا. أظهرت الدراسة التصنيفية من خلال تسلسل الحمض النووي الريبي S16 أن السلالات تنتمي للعائلات *Streptomycetaceae*, *Microbacteriaceae* و *Nocardiaceae* و معظمها ينتسب الى جنس ستربتومييساس. تم استكشاف التنوع الايضي للسلالات أيضا باستخدام معارض (BioMérieux) .api

من مجموعة الأكتينوبكتيريا المعزولة, تم اختيار 4 اكتينوبكتيريا و دراستها بشكل معمق. يتعلق هذا التوصيف بدراسة تصنيفية معتمدة على الخصائص الكيميائية, الفحص المجهرى الإلكتروني الخاص بمرفولوجيا البوغ، القدرة على احتمال مقاييس الاس الهيدروجيني, تركيزات كلوريد الصوديوم المختلفة و محتوى C+G . وكشفت الدراسة المتعمقة ان هذه السلالات متحملة للحرارة، و تفضل درجة حموضة قلوية. محتوى C+G لهذه السلالات منخفض و يتراوح من 41% الى 66%. جدرانها الخلوية من النوع I و مظهر الأحماض الدهنية الفوسفورية من النوع PII. و الأحماض الدهنية الخلوية المميزة المكتشفة هي: Anteiso-C15:0 , Anteiso-C17:0 , Iso-C16 :0 , Iso-C15:0 , Iso-C17:0.

الميناكينونات الموجودة أساسا هي : MK-9(H6) و MK-9(H8). تحتوي هذه السلالات على العديد من الانزيمات التي تعتبر مثيرة للاهتمام في مجال التكنولوجيا الحيوية مثل السليلاز، الاكسيلانيز، الليياز والبروتياز. تمت دراسة نشاط المضادات الحيوية لهذه السلالات 4 ضد 6 بكتيريا و 2 فطريات خيطية. هذه الاكتينوبكتيريا المتحملة للحرارة قادرة على انتاج مضادات حيوية ضد بكتيريا الاختبار المدروسة واحدة على الأقل.

## Résumé

La présence et la biodiversité des Actinobactéries dans quatre sources chaudes algériennes a été explorée à partir des échantillons d'eau de quatre sources thermales situées dans le Nord-Est Algérien. vingt-trois isolats morphologiquement distincts ont été isolés et identifiés. L'analyse des séquences d'ARNr 16S a montré que les isolats étaient assignés aux familles Streptomycetaceae, Nocardiaceae et Microbacteriaceae, la majorité étant affiliée au genre *Streptomyces*. La diversité métabolique des souches a été également explorée à l'aide des galeries api® (BioMérieux). Sur le lot d'actinobactéries isolés, 4 actinobactéries ont été sélectionnées et étudiées d'une manière plus approfondie. Cette caractérisation concerne la morphologie des spores par examen microscopique électronique, tolérance aux différents pH et concentrations de chlorure de sodium, la croissance à différentes températures, la teneur en G+C et la chimiotaxonomie. L'étude approfondie a révélées que ces souches sont des bactéries thermophiles facultatives, halotolérantes et préfèrent un pH alcalin. Le contenu de G+C de ces souches est assez faible est varié de 41% à 66%. Leur paroi cellulaire est de type I et leur profil phospholipidique de type PII. Les acides gras cellulaires caractéristiques détectés sont Anteiso-C15:0, Iso-C15:0, Iso-C16:0, Anteiso-C17:0 et Iso-C17:0. Les ménaquinones présents majoritairement sont les MK-9 (H6) et MK-9 (H8). Ces souches possèdent plusieurs enzymes très intéressantes du point de vue biotechnologique comme les cellulases, les xylanases, les lipases et les protéases. L'activité antimicrobienne de ces 4 souches a été effectuée vis-vis de 6 bactéries et 2 champignons filamenteux. Ces actinobactéries thermophiles facultatives sont capables de produire des composés antibiotiques antagonistes contre au moins une bactérie-tests étudiées.

**Mots clés :** Eaux thermales, *Actinobacteria*, *Streptomyces*, Activités enzymatiques, Activités antimicrobiennes.

## Abstarct

The presence and biodiversity of Actinobacteria in four Algerian hot springs was explored using water samples from four thermal springs located in northeastern Algeria. Twenty-three morphologically distinct isolates were isolated and identified. Analysis of the 16S rRNA sequences showed that the isolates were assigned to the Streptomycetaceae, Nocardiaceae and Microbacteriaceae families, the majority being affiliated to the genus *Streptomyces*. The metabolic diversity of the strains was also explored using the api® galleries (BioMérieux). From the batch of isolated actinobacteria, 4 actinobacteria were selected and studied further. This characterization concerns spore morphology by electron microscopic examination, tolerance to different pH and sodium chloride concentrations, growth at different temperatures and G+C content and chemotaxonomy. The in-depth study revealed that these strains are thermotolerant, halotolerant bacteria and prefer an alkaline pH. The G+C content of these strains is quite low and ranges from 41% to 66%. Their cell walls are type I and their phospholipid profiles are type PII. The characteristic cellular fatty acids detected are Anteiso-C15: 0, Iso-C15: 0, Iso-C16: 0, Anteiso-C17: 0 and Iso-C17: 0. The menaquinones present mainly are MK-9 (H6) and MK-9 (H8). These strains have several enzymes which are biotechnologically very interesting, such as cellulases, xylanases, lipases and proteases. The antimicrobial activity of these 4 strains was carried out against 6 bacteria and 2 filamentous fungi. These facultative thermophiles actinobacteria are capable of producing antagonist antibiotic compounds against at least one test bacteria studied.

**Keywords:** Thermal waters, *Actinobacteria*, *Streptomyces*, Enzymatic activities, Antimicrobial activities.



# Introduction

---

Au cours des dernières décennies, d'importants efforts de recherche ont été déployés pour explorer les extrémophiles dans les applications biotechnologiques et commerciales. La croissance dans des conditions extrêmes, les particularités physico-chimiques innovantes des molécules bioactives (enzymes, antibiotiques, hormones, etc...), issues de ces microorganismes, sont très recherchées dans les différentes biotechnologies (Singh 2006 et Coker, 2016). Parmi les extrémophiles, les bactéries thermophiles et thermo-tolérantes possèdent des capacités physiologiques très intéressantes. Ils peuvent croître de manière optimale et produire des composés économiquement bénéfiques à des températures élevées. Ces nouveaux groupes de microorganismes sont utilisés dans les différentes industries, en raison de leurs capacités de produire des composés très variés dans les secteurs de la chimie, de la pharmacie, et bien d'autres secteurs (Brock, 1986; Singh *et al.*, 2013; Shivilata et Satyanarayana, 2015).

La raison principale est la possibilité de réaliser des processus de fermentation à des températures nettement plus élevées, ce qui atténue les problèmes de contamination des fermenteurs par des mésophiles, en plus de plusieurs autres avantages économiques et techniques dans les processus de fermentation. L'industrie des enzymes a souffert d'un développement lent en raison de la non-disponibilité des catalyseurs enzymatiques thermostables. Le problème est encore aggravé parce que les enzymes de plusieurs organismes isolés du milieu naturel deviennent instables et dénaturées. Ce problème peut être surmonté en isolant des enzymes et des complexes d'enzymes des thermophiles et autres extrémophiles qui existent naturellement dans les écosystèmes extrêmes. Les enzymes thermostables isolées d'organismes thermophiles ont trouvé un certain nombre d'applications commerciales en raison de leur stabilité intrinsèque globale. Les actinobactéries thermophiles sont maintenant considérées comme de bonnes sources d'enzymes thermostables et nouvelles ayant une importance industrielle et chimique (Kikani *et al.*, 2010 ; Chavan *et al.*, 2013 ; Aditi et Nupur, 2016).

Les actinobactéries autrefois appelés actinomycètes, sont un groupe important et diversifié de bactéries à Gram positif qui ont des caractéristiques morphologiques similaires aux champignons. Sur le plan écologique, ils jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus biologiques tels que les cycles biogéochimiques, la bioremédiation (Chen *et al.*, 2015), la bioaltération (Cockell *et al.*, 2013) et la promotion de la croissance des plantes (PGP) (Palaniyandi *et al.* , 2013). Préalablement, ces bactéries sont bien connus d'être une source importante de composés pharmaceutiques (antibiotiques, agents anti-tumoraux, composés

anti-inflammatoires et inhibiteurs d'enzymes), Les actinobactéries représentent près des deux tiers des antibiotiques produits par les micro-organismes (Challis et Hopwood, 2003) et sont la principale source de plus de 70% de produits bioactifs utilisés en thérapie humaine (Bérdy, 2005). Depuis la découverte de la streptomycine (premier médicament antituberculeux découvert à partir des actinobactéries), les programmes de découverte et de développement de médicaments ont privilégié les agents antimicrobiens plutôt que les composés chimiques. Par la suite, un grand nombre d'espèces actinobactériennes ont été recherchées pour la découverte de composés cliniquement précieux. Le phylum *Actinobacteria* contient plusieurs genres englobant des espèces productrices d'antibiotiques. Le genre *Streptomyces* est une source importante de métabolites secondaires, en particulier d'antibiotiques. Les espèces de *Streptomyces* sont connues pour produire plus de 50% du total des antibiotiques microbiens connus ( $\geq 10\ 000$ ). Malgré la disponibilité d'un nombre énorme de médicaments cliniques, de nombreuses sociétés pharmaceutiques et laboratoires de recherche sont engagés dans la recherche de nouveaux médicaments thérapeutiques pour lutter contre les agents pathogènes microbiens. Cependant, l'apparition constante des souches pathogènes multirésistantes, et l'augmentation du nombre d'infections fongiques provoquent de graves épidémies dans plusieurs pays et suscite ainsi un regain d'intérêt pour trouver de nouveaux réservoirs de composés biologiquement actifs (Zerikly et Challis, 2009). La découverte de nouveaux métabolites secondaires est une condition préalable au développement de nouveaux produits pharmaceutiques. Cette nécessité dicte la recherche de nouveaux métabolites bioactifs dans divers habitats inexplorés ou sous-explorés (Bérdy, 2012). Tout ces intérêts et raisons ont motivé les chercheurs à l'exploitation et l'investigation des actinobactéries au sein des habitats spéciaux, notamment les environnements extrêmes (Holmes *et al.*, 2000, Qin *et al.*, 2009, Manivasagan *et al.*, 2013, Nimaichand *et al.*, 2015). Bull (Bull, 2011), a également souligné l'importance de l'isolement des actinobactéries de l'extrémobiosphère.

Les actinobactéries ont longtemps été isolées principalement des sols (McVeigh *et al.*, 1996; Hayakawa *et al.*, 2000; Tyagi *et al.*, 2014; Harir *et al.*, 2017) et des eaux (Goodfellow *et al.*, 1983; Hayakawa *et al.*, 2000; Radhika *et al.*, 2011). Partant du principe que les actinobactéries extrémophiles pourraient être une source de nouveaux métabolites précieux, plusieurs chercheurs ont orienté leurs recherches vers les écosystèmes les plus rudes et les moins explorés afin de découvrir des molécules aux potentialités nouvelles. Ainsi, ces bactéries ont été trouvées dans les sédiments marins (Goodfellow et Haynes 1984 ; Pathomaree *et al.*, 2006 ; Claverias *et al.*, 2015), dans les lacs salés (Oren, 2002; Tang *et al.*, 2010),

dans les sols arides (Sabaou *et al.*, 1998; Boudemagh *et al.*, 2005; Mohammadipanah et Wink, 2016) et dans de nombreux autres écosystèmes (Kitouni *et al.*, 2005; Bull, 2011; Qin *et al.*, 2016).

Les sources chaudes sont des unités écologiques moins explorées pour exploiter la source microbienne des nouveaux composés bioactifs. Fait intéressant, la première bactérie thermophile *Thermus aquaticus* a été isolée des sources chaudes et des sites de geysers du parc national de Yellow Stone par Brock (Brock et Freeze, 1969; Brock, 1997) et la découverte de l'enzyme Taq polymérase de ce micro-organisme a révolutionné complètement le domaine de la recherche sur les acides nucléiques. De même, les études sur la biodiversité des actinobactéries dans les eaux thermales sont très rares et ont montré des résultats divers. En effet, certains chercheurs ont constaté que les actinobactéries semblent absentes dans les eaux très acides et les sources chaudes d'origine volcanique (Goodfellow et Williams, 1983). D'autres ont observé que les sources chaudes sont très pauvres en actinobactéries (Lacey, 1988). Néanmoins, la présence d'actinobactéries dans certains de ces écosystèmes a été signalée (Xu *et al.*, 1998). Dans la même étude, une nouvelle espèce nommée *Streptomyces thermogriseus* a été isolé des sources chaudes, des lacs et des sols du Yunnan, en Chine (Xu *et al.*, 1998). Dans des recherches relativement récentes; plusieurs Actinobactéries appartenant à des genres connus ou inconnus ont été isolées et identifiées sur trois sources chaudes situées à Tengchong (Chine), au Kamchatka (Russie) et au Nevada (USA) (Song *et al.*, 2009). Liu *et al.*, 2016 ont également reporté la diversité des actinobactéries cultivables appartenant à plusieurs genres, associées aux sources chaudes situées dans le comté de Tengchong, province du Yunnan, sud-ouest de la Chine (Liu *et al.*, 2016).

A ce jour et selon nos connaissances, les isollements des actinobactéries à partir des eaux thermales sont encore très rares. Les sources chaudes sont pauvres en matière organique, mais riches en cations (comme le sodium et le calcium) et anions (comme les chlorures, les bicarbonates et les sulfates). Cette composition chimique combinée à la température élevée de ces eaux, confère aux microorganismes un écosystème des plus extrêmes et uniques. Par conséquent, les bactéries oligotrophes et en particulier les actinobactéries, qui nichent ces écosystèmes, peuvent montrer une adaptabilité exceptionnelle qui peut avoir des caractéristiques métaboliques intéressantes.

Le but de ce travail est d'isoler et d'identifier les Actinobactéries de certaines sources chaudes situées dans la région Nord-est de l'Algérie. Nous déterminons également la biodiversité physiologique et métabolique de ces bactéries et leur potentiel biotechnologique en tant que producteurs d'enzymes hydrolytiques et des molécules antagonistes.

# Revue Bibliographique

---

## Chapitre 1 : Les Actinobactéries

### 1-1 Généralités

Le phylum *Actinobacteria* est l'un des phylums les plus dominants dans le domaine bactérien (Ventura *et al.*, 2007). Il comprend des genres hétérogènes majoritairement à Gram positif ou à Gram variable. Le phylum comprend également quelques espèces à Gram négatif telles que *Thermoleophilum sp.* (Zarilla et Perry, 1986), *Gardenerella vaginalis* (Gardner et Dukes, 1955), *Saccharomonospora viridis P101T* (Pati *et al.*, 2009), *Ferrimicrobium acidiphilum* et *Ferrithrix thermotolerans* (Johnson *et al.*, 2009). Ce groupe de bactérie comprend plus de 30 familles taxonomiquement différentes. Parmi les actinobactéries, les streptomycètes dominant et les non-streptomycètes sont appelés actinobactéries rares, comprenant environ 100 genres. Les actinobactéries sont soit aérobies ou anaérobies. Ce sont des bactéries mobiles ou immobiles possédant ou pas des spores ayant un coefficient de Chargaff (GC%) élevé compris entre 60-70% (Ventura *et al.*, 2007, Prescott *et al.*, 2010). La taille du génome des actinobactéries varie de 0,93 Mb (*Tropheryma whippelii*) (Bentley *et al.*, 2003) à 12,7 Mb (*Streptomyces rapamycinicus*) (Baranasic *et al.*, 2013). Ce génome existe sous forme circulaire ou linéaire. Généralement, les actinobactéries sont hétérotrophes ou chimioautotrophes, mais la plupart sont chimiohétérotrophes et capables d'utiliser une grande variété de sources nutritionnelles, y compris divers polysaccharides complexes (Lechevalier et Lechevalier, 1965; Zimmerman, 1980).

La densité de population des actinobactéries dépend de leurs habitats et des conditions climatiques dominantes. D'autres facteurs, tels que la température, le pH et l'humidité du sol, influencent également la croissance des actinobactéries. Les actinobactéries sont pour la plupart mésophiles, avec une croissance optimale à des températures comprises entre 25 et 30 °C. Cependant, les actinobactéries thermophiles peuvent se développer à des températures allant de 50 à 60 °C (Edwards, 1993). La majorité des actinobactéries poussent dans des écosystèmes à pH neutre. Ils poussent mieux à un pH compris entre 6 et 9, avec une croissance maximale autour de la neutralité. Cependant, quelques souches de *Streptomyces* ont été isolées de sols acides (pH 3,5) (Kim *et al.*, 2003). Les actinobactéries sont présentes dans diverses niches écologiques et peuvent être des habitants du sol ou des milieux aquatiques (*Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* et *Salinispora*), des symbiotes végétaux (*Frankia spp.*), Des agents pathogènes végétaux ou animaux (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* ou *Nocardia*) ou commensaux gastro-intestinaux (*Bifidobacterium spp.*) sont également décrits. Ils sont caractérisés par un cycle de vie complexe qui inclut leur existence

sous forme de spores dormantes ou d'hyphes en croissance active. Ils sont dans la majorité des cas, commensaux et inoffensifs; à l'exception de certains d'entre eux, notamment ceux appartenant au genre *Mycobacterium* (*Mycobacterium tuberculosis*). Leur diversité morphologique les caractérise, allant du coccoïde (*Micrococcus*), bâtonnet-coccoïde (*Arthrobacter*), formes hyphales fragmentaires (*Nocardia*) au mycélium ramifié (*Streptomyces*). La reproduction chez les actinobactéries se fait soit par mode végétatif via la fragmentation des mycéliums soit par mode asexué (formation de spores ou de conidies). Ils produisent soit une seule spore (monosporique), soit une paire de spores (bisporiques), ou encore de nombreuses spores (oligosporiques) sur le mycélium aérien ou celui du substrat. Les actinobactéries oligosporiques présentent sur le mycélium, des schémas distincts de disposition des spores (crochues, droites ou ondulées). Le Groupe actinobactérien qui développe des ramifications filamenteuses autour de leurs colonies d'une forme circulaires en générale, les rapprochent morphologiquement des champignons filamenteux. Leurs colonies adhèrent fermement à la surface de la gélose, produisant des hyphes et des conidies/sporanges comme celles des champignons dans les milieux de culture. L'accumulation d'hyphes donne naissance à une pigmentation et des aspects atypiques à contour lisse ou échancré, compacte, pulvérulent ou en chou-fleur. Elles ont tendances à croître lentement (0.5-1.0 µm de diamètre) (Eunice., 1983) et le temps de génération moyen de leur croissance est de 2 à 3 heures, ce qui rend leur croissance plus lente que celle des autres bactéries (Ottow et Glathe, 1968; Larpent et Sanglier, 1989).

Les actinobactéries représentent l'une des lignées les plus primitives parmi les procaryotes (Koch, 2003) qui auraient évolué il y a environ 2,7 milliards d'années (Battistuzzi et Hedges, 2009). Ils forment une branche distincte sur l'arbre du gène de l'ARNr 16S (Zhi *et al.*, 2009). Ils se distinguent des autres taxons bactériens sur la base de leurs schémas d'agencement génétique singuliers (Kunisawa, 2007) et des indels conservés présents dans les deux ARNr 23S et des protéines (par exemple, la sous-unité I des enzymes cytochrome C oxydase, la CTP synthétase et la glutamyltRNA synthétase) (Gao et Gupta, 2005).

Leur classification a été révisée plusieurs fois dans le passé. Selon le système de classification récent, ceux-ci sont placés sous Phylum XXVI, Actinobacteria dans le Domain II (Bacteria) du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 5. Ce phylum contient un large éventail de genres chimiotaxonomiquement, morphologiquement et physiologiquement distincts, regroupés en six classes principales (*Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteria*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* et *Thermoleophilia*) (Goodfellow *et al.*, 2012).



Ces bactéries sont bien connues pour la production de plusieurs composés bioactifs. Il s'agit principalement d'un nombre énorme d'enzymes avec un potentiel industriel et clinique important. Ces bactéries ont également un fort intérêt économique notamment par la production de molécules à activité antibiotique ou par leur importance dans la fermentation des produits laitiers. Sur le plan écologique, ils jouent un rôle important dans la décomposition des matières organiques, telles que la cellulose et la chitine, jouant ainsi un rôle vital dans le renouvellement de la matière organique et le cycle du carbone, reconstituant l'apport des nutriments dans le sol qui est une partie reponsable de la formation de l'humus.

## **1-2 Habitats**

### **1-2-1 Environnement terrestre**

Le sol reste l'habitat le plus important pour les actinobactéries, les *Streptomyces* constituent la composante majeure de sa population. Selon de nombreux rapports, ce genre s'est révélé être le plus abondamment isolé à partir du sol et ce dans la majorité des études. Les actinobactéries terrestres ont d'importantes aptitudes à produire des biomolécules divers comme les antibiotiques, les enzymes, les déserbants, les pesticides, les antitumoraux et bien d'autres molécules. Les antibiotiques sont parmi les biomolécules les plus synthétisés par ces bactéries. Plusieurs travaux ont montré le rôle des actinoactéries terrestres à produire ces molécules. Oskay *et al* ont isolé des actinobactéries qui avaient la capacité de produire de nouveaux antibactériens (Oskay *et al.*, 2005). Dans l'étude de Nithya *et al.*, 134 Actinobactéries morphologiquement distinctes ont été isolées à partir de 10 échantillons de sol désertique différents, les isolats ont montré un niveau d'activité antibactérienne avéré contre plusieurs agents pathogènes bactériens testés (Nithya *et al.*, 2015). Les travaux récents de ce domaine, sont entrepris par des chercheurs du monde entier (Boudemagh *et al.*, 2005 ; Kitouni *et al.*, 2005, Chaudhary *et al.*, 2013; Elbendary *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Ouchari *et al.*, 2019). La liste des travaux sur l'isolement à partir des différents sols, des actinoactéries possédants des activités antibiotiques est très longue et très fastidieuse pour être exposée dans son intégralité.

Les enzymes sont après les antibiotiques, les molécules bioactives les plus largement produits par les actinobactéries, compte tenu de leur hétérogénéité biochimique, leur diversité écologique et leur capacité exceptionnelle à produire des métabolites secondaires en font une cible évidente pour les enzymes présentant de nouvelles activités et/ou spécificités. Plus récemment, ils se sont avérés être une source prometteuse d'une large gamme d'enzymes

d'importance industrielle, en particulier des espèces *Streptomyces*, en tant que source de nouvelles enzymes, de nombreuses études se sont concentrées sur la compréhension de la diversité des actinobactéries dans les écosystèmes terrestres et sur leur capacité de production d'enzymes (Charousová *et al.*, 2017; Medouni-Haroune *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019; Swarna et Gnanadoss, 2020; Penuliar et Daquioag, 2021 ).

Les actinobactéries sont aussi des producteurs d'autres molécules intéressantes comme ceux qui ont des effets anticancéreux. En effet, dans des investigations dans le même domaine, les résultats montrent que le genre *Nocardia* isolé du sol des mangroves, produit de nouveaux métabolites cytotoxiques qui ont fortement inhibé des lignées cellulaires humaines, comme l'adénocarcinome gastrique (Schneider *et al.*, 2006).

La rhizosphère est considérée parmi les meilleures niches écologiques pour les actinobactéries du sol. Ces bactéries jouent un rôle majeur dans le renouvellement de la matière organique végétale même récalcitrante. Ils sont responsables d'une antibiose importante dans ces niches écologiques. Priyadharsini *et al* dans leur étude, ont isolé 45 colonies distinctes à partir de 12 différents sols de rizières et ont observé leur capacité à inhiber la croissance de *Cyperus rotundus* qui est une adventis très répandue. Les bactéries *actinorhyziennes* isolées appartiennent aux genres *Streptomyces sp.*, *Streptoverticillium sp.*, *Actinomadura sp.*, *Kitasatosporia sp.*, *Nocardiosis sp.*, *Pseudonocardia sp.* et *Kibdelosporangium sp* (Priyadharsini *et al.*, 2013). Dans la rhizosphère de la mangrove anoxique, les espèces actinobactériennes telles que *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Nocardioform* se sont avérées abondantes. Cette microflore restent cependant 1000 à 10000 fois plus abondante que celle isolée à partir des terres arabes (Tan *et al.*, 2009).

Il existe plusieurs rapports montrant la répartition des actinobactéries dans divers niches telluriques. Les exemples sont multiples nous en citons que quelques unes. Il s'agit par exemple des sols sablonneux (du Caire en Égypte; Falmouth, au USA), le sol alcalin noir (de Karnataka en Inde), le sol sableux de loam (en Keffi Metropolis au Nigeria et Presque Isle au USA), le sol de dessert alcalin (de Wadi El Natrun et de WadiAraba en Égypte) et le sol du dessert subtropical (du desert de Thar dans le Rajasthan en Inde). Dans tous ces endroits les *Streptomyces sp.* dominaient. Ils sont suivis par d'autres genres actinobactériens, tels que *Nocardia*, *Nocardiosis* et *Actinomycetes* (Cundell et Piechoski, 2016).

### **1-2-2 Environnement aquatique**

Les actinobactéries sont largement distribuées dans les habitats aquatiques, qui peuvent parfois être emportés des habitats terrestres environnants. Il s'agit par exemple du cas

des endospores résistantes de *Thermoactinomyces* produites dans des composts auto-chauffants, des fourrages surchauffés et des sols de surface, qui peuvent être lavées dans des habitats aquatiques pour finir dans les boues et les sédiments. Il a été supposé que ces thermophiles ne pouvaient pas croître à température ambiante dans la plupart des habitats aquatiques.

#### **a- Les eaux douces**

Dans les travaux de Cross, il a été démontré que les actinobactéries peuvent être facilement isolées à partir des eaux douces. Les principaux types d'actinobactéries vivant dans les eaux douces appartiennent aux genres *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* et *Thermoactinomyces* formant des endospores (Cross., 1981). Les *Actinoplanes* se trouvent couramment dans les sols, les rivières et les lacs. Les vésicules de spores de ces organismes ont la capacité de résister à une dessiccation prolongée. Elles libèrent leurs spores mobiles pour la dissémination lorsqu'elles sont réhydratées (Makkar et Cross., 1982). Les zoospores sont mobiles au moyen d'une touffe de flagelles présentant une chimiotaxie et nécessitent une source d'énergie exogène. Les espèces du genre *Micromonospora* sont également considérées comme des actinobactéries d'eaux douces courantes. Elles se sont révélées indigènes dans ces habitats où elles renouvellent de la cellulose, la chitine et la lignine. De nombreux rapports ont confirmé la présence de *Micromonospora* dans les ruisseaux, les rivières et les sédiments fluviaux. Ils sont considérés comme faisant partie intégrante de la microflore aquatique. Johnston et Cross ont constaté que les streptomycètes ne se développaient pas dans divers lacs, notamment dans les couches de boue plus profondes où les espèces du genre *Micromonospora* étaient prédominantes (Johnston et Cross., 1976). Tandis qu'une autre étude d'Al-Diwany et al ont montré une corrélation significative entre les *Micromonospora* et des thermoactinomycètes isolés à partir de la rivière Wharfe dans le West Yorkshire. Un nombre important des espèces du genre *Micromonospora* a été trouvé dans le sol adjacent (Al-Diwany *et al.*, 1978). Une étude a révélé que les spores de *Micromonospora* ont été emportées dans des habitats d'eau douce où elles peuvent rester dormantes pendant plusieurs années (Cross., 1981). Bien que les spores de *Streptomyces* soient également continuellement acheminées dans les habitats d'eau douce et marins, il n'y a que peu de preuves qu'elles peuvent être actives dans de tels environnements. L'existence de *Streptomyces* aquatiques a été revendiquée, mais Al-Diwany et al ont trouvé un degré élevé de corrélation entre les dénombrements des streptomycètes, de streptocoques fécaux et des rhodocoques (Al-Diwany *et al.*, 1978). Les autres habitants des eaux douces comprennent les

espèces *Actinomadura madurae*, *Mycobacterium kansasii*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* et *Nocardia*. La concentration de spores hydrophobes et d'hyphes à l'interface eau/air peut augmenter le nombre de *Streptomyces*, de *Micromonospora* et des *Rhodococcus* dans la mousse des eaux de rivières. Les preuves montrent clairement que les actinobactéries peuvent devenir actives dans les écosystèmes d'eaux douces en présence de substrats et de conditions de croissance appropriés plutôt que de s'adapter spécifiquement pour vivre dans un tel environnement.

### **b-Environnement marin**

La comparaison entre la diversité actinobactérienne en milieu terrestre et dans les océans, révèle qu'elle est plus importante dans les milieux marins. Ce milieu constitue donc une source inépuisable de nouvelles actinobactéries qui peuvent offrir des métabolites innovants. Les actinobactéries marines vivant dans un environnement extrêmement différent produisent différents types de composés bioactifs par rapport à ceux isolés des milieux terrestres. Les actinobactéries provenant des sources marines se sont probablement adaptées à des conditions de pression élevées, à l'absence d'oxygène, à des températures basses de 0 à 8 °C dans les fonds marins et à l'acidité élevées à des températures allant de 8 à 100 °C près des événements hydrothermaux. La première espèce marine d'Actinomycètes caractérisée est *Rhodococcus marinonascens*. Les membres des genres *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris* et *Verrucosipora* ont été désignés comme actinobactéries marines indigènes (Stach *et al.*, 2004; Bull *et al.*, 2005). D'autres actinobactéries ont été isolées à partir de divers environnements marins, telles que le fond marin, les invertébrés marins, la neige marine, le sol du littoral et les sédiments marins (Inagaki *et al.*, 2003; Grossart *et al.*, 2004; Stach *et al.*, 2004; Dhanasekaran *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2005; Dhanasekaran *et al.*, 2010; Dhanasekaran *et al.*, 2014). Les isolats obtenus à partir de ces écosystèmes uniques, offrent divers nouveaux métabolites totalement inconnus. Même avec les efforts limités de recherche qui ont été consacrés à ce jour aux actinobactéries marines, le taux de découverte de nouveaux métabolites secondaires à partir d'actinobactéries marines a récemment été dépassé par rapport à ses homologues terrestres.

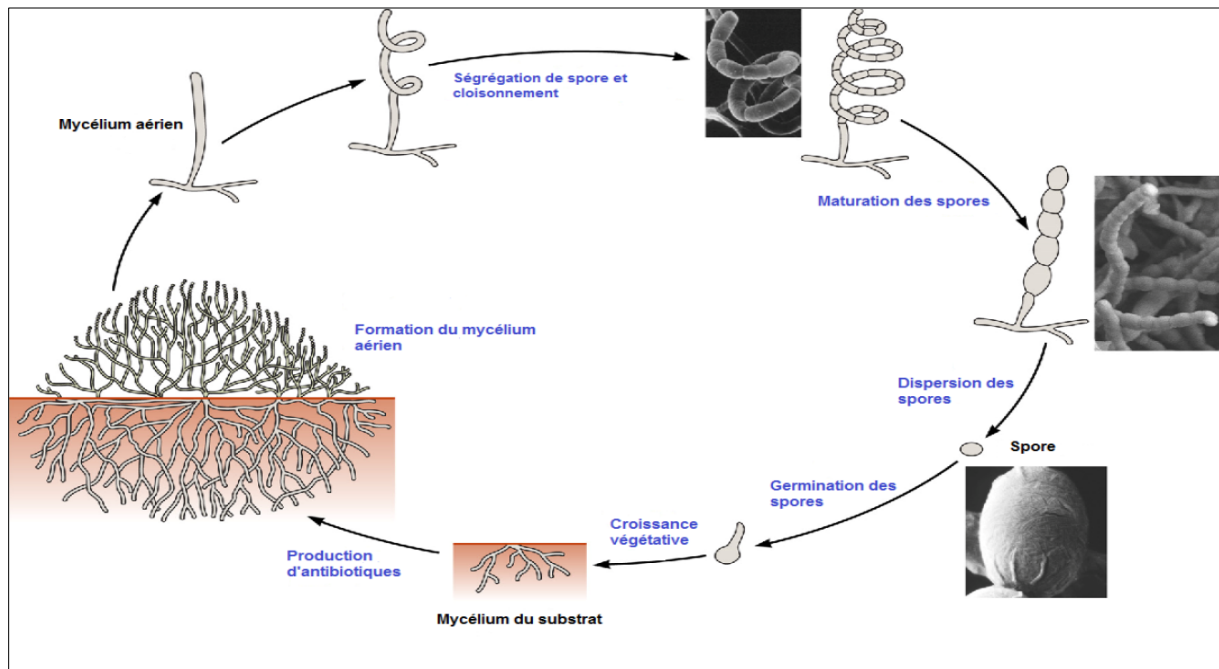
### **1-3 Biologie du développement**

Les *Streptomyces* et certains autres genres des actinobactéries présentent des signes d'évolution parallèle avec des champignons filamenteux (Kalakoutskii et Agre, 1976; Ensign,

1978). Ils possèdent cependant deux caractéristiques qui les distinguent des autres microorganismes: leur capacité à synthétiser une panoplie de métabolites secondaires et leur cycle de développement et de reproduction. La croissance est généralement de type filamenteux à différents stades de développement avec des spécificités caractéristiques à chaque espèce, d'où une grande diversité morphologique. Les actinobactéries se reproduisent par fission binaire ou en produisant des spores ou des conidies. La sporulation se fait par fragmentation et segmentation ou formation de conidies. Le cycle de vie de la plupart des actinobactéries et spécialement ceux appartenant au genre *Streptomyces* commence par la germination d'une spore qui se développe pour former des hyphes végétatifs. Ensuite un processus de croissance et de ramification des hyphes se traduit par la production d'un mycélium végétatif à ramifications complexes (Chater, 1972) (**Figure 1**). La caractéristique importante des hyphes végétatifs est le développement par extension apicale (Flårdh, 2003). Cela contraste avec les bactéries unicellulaires, comme *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*, où l'élongation cellulaire est obtenue par l'incorporation de nouveau matériau de paroi cellulaire dans la paroi latérale (Donachie, 1993). La croissance exponentielle des hyphes végétatifs est obtenue par une combinaison d'une croissance apicale et des ramifications. Le fait que la division cellulaire au cours de la croissance végétative n'entraîne pas la fission cellulaire mais plutôt des parois transversales qui séparent les hyphes en compartiments connectés (Wildermuth et Hopwood, 1970) font des *Streptomyces*, un rare exemple de bactérie multicellulaire. Chaque compartiment contenant plusieurs copies du chromosome (Elliot *et al*, 2008; Claessen *et al*, 2014). L'espacement des parois transversales végétatives varie considérablement, à la fois entre les différentes espèces de *Streptomyces* et au sein des espèces individuelles entre les différentes conditions de croissance et les âges mycéliens.

Dans des conditions défavorables, comme l'épuisement des nutriments, le mycélium végétatif se différencie pour former des structures sporogènes érigées appelées hyphes aériens. C'est également le moment du cycle de vie où la plupart des antibiotiques sont produits (Bibb, 2005; Van Wezel et McDowall, 2011). Les *Streptomyces* et autres actinobactéries filamenteux sont sessiles. En cas d'épuisement des nutriments, le mycélium végétatif ou substrat est dégradé de façon autolytique par un mécanisme de type mort cellulaire programmée (PCD), afin d'acquérir les blocs de construction nécessaires à l'érection d'une deuxième masse de mycélium (aérien) (Méndez *et al*, 1985; Wildermuth, 1970). La PCD entraîne l'accumulation d'acides aminés, d'osamines, de nucléotides et de lipides autour du mycélium du substrat de lyse (Fernández et Sánchez, 2002; Rigali *et al*, 2006), qui attirent inévitablement des microbes compétitifs mobiles dans l'habitat. Il est donc logique de

supposer que des antibiotiques sont produits à ce moment pour protéger le réservoir de nutriments.

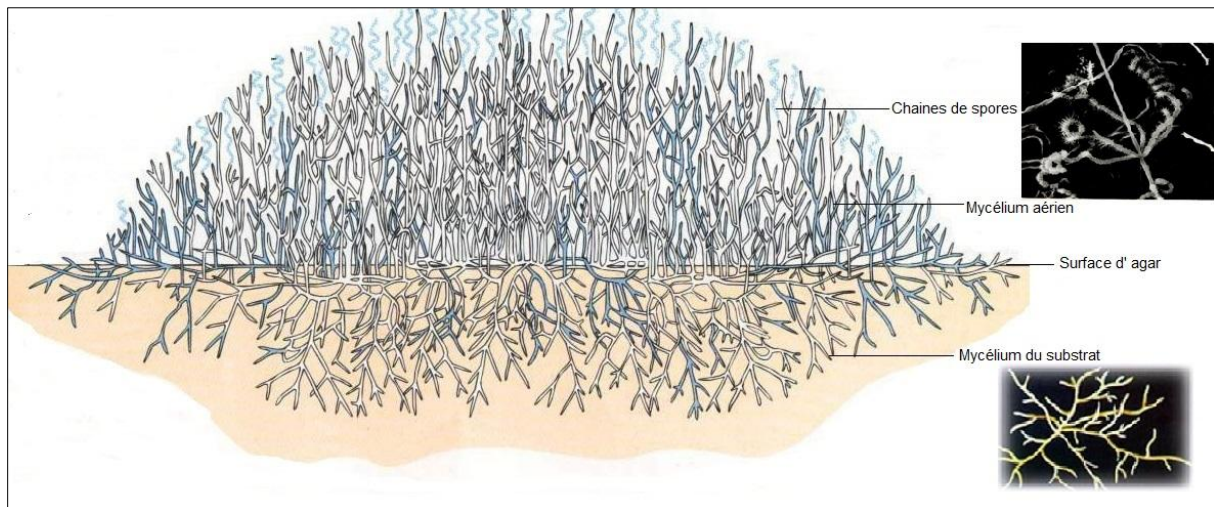


**Figure 1.** Représentation schématique du cycle de vie des actinobactéries sporulantes (Barka *et al.*, 2016).

### 1-3-1 Caractéristiques morphologiques basiques des actinobactéries

Les actinobactéries présentent la plus grande différenciation morphologique parmi les bactéries Gram-positives. Cependant, la structure cellulaire des actinobactéries est typiquement procaryotique et totalement différentes des champignons. Toute la structure d'une cellule hyphale correspond à l'organisation de la structure d'une cellule bactérienne: le cytoplasme contient des régions d'ADN génomique, des ribosomes et diverses inclusions, vraisemblablement des substances de réserve telles que des polyphosphates, des lipides ou des polysaccharides. Les actinobactéries classiques ont un mycélium radial bien développé. Selon la différence de morphologie et de fonction, le mycélium peut être divisé en mycélium de substrat et mycélium aérien (**Figure 2**). Certaines actinobactéries peuvent former des structures complexes, telles que les spores, les conidies, les chaînes de spores, les sporanges et les sporangiospores. Les modes de croissance et de fragmentation du mycélium de substrat, la position des spores, le nombre de spores, les structures de surface des spores, la forme des

sporangies et le fait que les sporangiospores aient ou non des flagelles sont toutes des caractéristiques morphologiques importantes de la classification des actinobactéries.



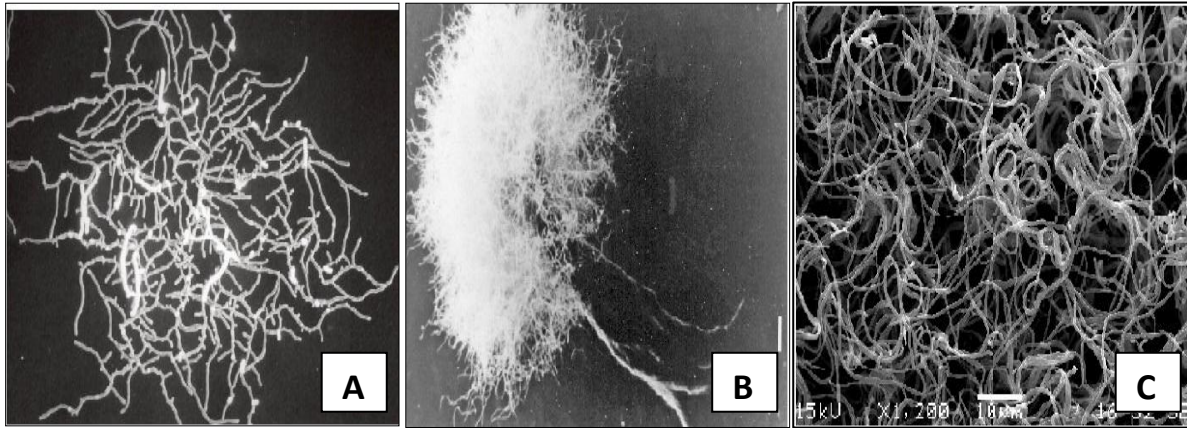
**Figure 2.** Colonie d'actinobactérie poussant sur gélose (morphologie courante des actinobactéries, coupe transversale d'une colonie d'actinobactéries montrant le substrat mycélium et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores) (Qinyuan *et al.*, 2016).

### 1-3-1-1 Mycélium du Substrat

Connu aussi sous les noms de mycélium végétatif ou mycélium primaire, le mycélium de substrat se développe dans le milieu ou à la surface du milieu de culture. La fonction principale du mycélium du substrat est l'absorption des nutriments pour la croissance des actinobactéries. Au microscope, le mycélium du substrat est mince, transparent, sombre et plus ramifié que l'hyphe aérien. Les hyphes simples ont une épaisseur d'environ 0,4 à 1,2  $\mu\text{m}$ , ne forment généralement pas de diaphragmes et de fragmentation, capables de développer des branches. Les groupes minoritaires (tels que *Nocardia*), rudimentaires à largement ramifiés comme les racines, les hyphes du substrat se fragmentent souvent in situ ou lors d'une perturbation mécanique en éléments non mobiles possédant la forme coccoïdes ou formant des bâtonnets lorsqu'ils sont cultivés à un certain stade (**Figure 3A**). Les *Actinosynnema* sont différenciés en mycélium du substrat avec des hyphes à longues ramifications qui pénètrent dans la gélose et se développent et forment également des synnèmes (**Figure 3B**). Dans certains genres, les hyphes forment des sclérotés (**Figure 3C**).

Le mycélium du substrat est blanc, jaune, orange, rouge, vert, bleu, violet, marron, noir et autres couleurs. Certains hyphes peuvent produire des pigments hydrosolubles ou liposolubles. Le pigment soluble dans l'eau peut s'infiltrer dans le milieu de culture, ce qui donne au milieu la couleur correspondante. Le pigment non soluble dans l'eau (ou liposoluble) donne à la

colonie avec la couleur correspondante. La couleur du mycélium du substrat et la présence de pigments solubles constituent des références importantes dans la détermination de nouvelles espèces.



**Figure 3.** (A) La fragmentation du mycélium de substrat et la véritable ramification de *Nocardia asteroides*. (B) *Actinosynnema mirum* IFO 14064T -Les synnèmes sont formés sur un milieu solide. (C) *Streptoalloteichus tenebrarius* NBRC 16177T (Qinyuan *et al.*, 2016).

### 1-3-1-2 Mycélium aérien

Le mycélium aérien est l'hyphe que le mycélium de substrat développe dans l'air à un certain stade de la croissance de l'actinobactérie (**Figure 2**). Les hyphes du substrat sont minces, transparents et sombres. Cependant, les hyphes aériens sont grossiers, réfractifs et brillants. Les hyphes du mycélium aérien sont caractérisés par une gaine fibreuse, à l'exception des genres *Pseudonocardia* et *Amycolata* (Warwick *et al.*, 1994). L'ultra-microscopie, montre que le mycélium aérien est composé d'éléments fibrillaires et de petits bâtonnets, formant un motif caractéristique. La gaine fibreuse est également présente sur les hyphes aériens de sporulation, provoquant les différents ornements de surface de la spore (Wildermuth *et al.*, 1971; Kalakoutskii et Agre, 1976). La formation de toutes sortes d'hyphes aériens d'actinobactéries dépend des caractéristiques de l'espèce, des conditions nutritionnelles ou du facteur environnemental. Le mycélium aérien de certains genres se développe à un certain stade de la chaîne de spores de la forme supérieure, qui est une spore reproductrice produisant des spores.

### 1-3-1-3 Les spores

Après le développement d'hyphes spécialisés, le prochain événement est le développement de structures sporulées. Une grande variété peut être trouvée chez les



actinobactéries, allant des structures de type eubactérien à celles ressemblant à des structures fongiques (Locci, 1979). La division d'une hyphe et la production d'une spore commencent par la formation d'une paroi transversale. En général, il existe trois types de méthodes de processus de sporulation des actinomycètes:

- (i) Lorsque les hyphes du substrat sont fragmentés, le septum, connu sous le nom de septum fendu, peut apparaître et former des spores, comme le genre *Micromonospora*.
- (ii) Les spores sont formées par septation et désarticulation d'éléments hyphales préexistants avec une mince gaine fibreuse. La paroi des spores est formée, au moins en partie, des couches de paroi de l'hyphe parentale. Ceci est appelé développement holothallique (Locci et Sharples, 1984). Il est typique de nombreux autres actinomycètes comme le genre *Streptomyces*.
- (iii) Des spores globuleuses se forment dans le mycélium aérien et substrat, comme certaines souches de *Thermoactinomyces*.

Les spores sont des endospores classiques avec toutes les propriétés des endospores bactériennes, par rapport au processus de formation, à l'ultrastructure et à la physiologie. La formation de spores est le critère morphologique le plus important pour reconnaître un actinomycète. Un certain nombre de gènes sont responsables de la formation de spores (Chater, 1979; Chater et Chandra, 2006). Les différentes conditions de culture peuvent avoir une influence sur la formation de spores. Les caractéristiques des spores jouent un rôle très important dans la description des espèces depuis de nombreuses années. Les spores produites individuellement ou en chaînes courtes sont généralement plus épaisses que les hyphes, tandis que celles qui sont développées en longues chaînes ont généralement le même diamètre que les hyphes. Les spores ont une épaisseur d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$  et varient en termes de forme et de caractéristiques de surface (**Figure 5**). Les spores ont cependant toutes une morphologie commune. Elles sont globuleuses, ovoïdes, en forme de bâtonnet, allantoides et réniformes. Les actinobactéries sont capables de produire des spores mobiles équipées de flagelles qui assurent un mouvement actif (**Figure 6**). Les spores peuvent être aussi non mobiles pour certaines espèces. Elles sont soit lisses ou rugueuses. En plus, les spores sont soit:

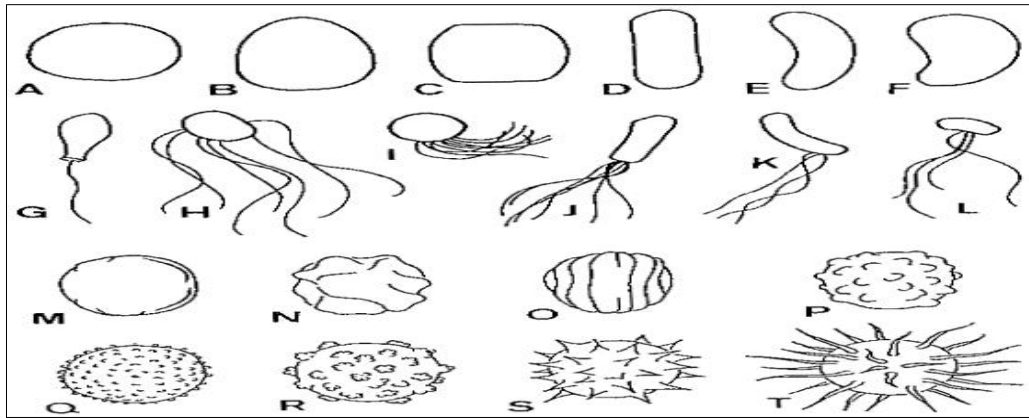
**Des endospores**, produites suite à une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Ces endospores sont produites par des actinobactéries thermophiles tel que *Thermoactinomyces*. Elles sont semblables à celles produites par les

*Bacillaceae*. Elles sont résistantes à la chaleur, grâce à leur paroi externe épaisse multicouche qui enveloppe le cortex, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes et le nucléoïde. L'acide dipicolinique joue également un rôle dans la résistance des endospores à la chaleur. Ces endospores peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies (Sykes et Skinner, 1973).

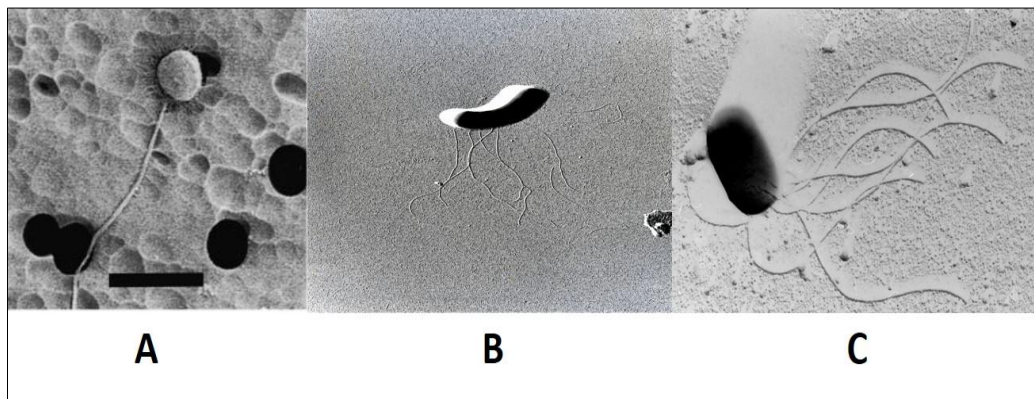
**Des Exospores**, appelées aussi les spores de segmentation. Elles sont produites suite à des cloisonnements à l'intérieur des hyphes (Waksman, 1959), couramment suite à une réponse à une privation en aliments. Cette caractéristique est retrouvée chez les hyphes du genre *Streptomyces*. Les exospores ne sont pas très résistantes à la chaleur mais elles peuvent s'adapter et supporter la dessiccation (Prescott *et al.*, 2007).

Les spores des actinobactéries peuvent s'organiser en diverses structures particulières:

- **Les conidies**, ce sont des spores asexuées. Elles peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), 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*) ;
- **les Sporangies**, ce sont des sacs qui contiennent les spores, qui peuvent être mobiles à l'aide de flagelles (*Actinoplanes*) ou immobiles comme (le genre *Streptosporangium*) (Kalakoutskii et Agre, 1976).
- **Les sclérotés** trouvés chez le Genre *Chainia*, elles sont assemblées par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés;
- **Les Synnemata**, appelés également corémies sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.



**Figure 4.** Caractéristiques morphologiques des spores. Forme générale des spores: (A) globuleuses, (B) ovoïdes, (C) doliformes, (D) en forme de bâtonnet, (E) allantoïdes, (F) réniformes. Type de flagellation: (G) monopolaire monotriches, (H) pérित्रiches, (I) polytrichées, (J) monoploarpolytrichées (= lophotriches), (K) polytrichées subpolaires, (L) polytrichées latérales. Ornementation de surface: (M) lisse, (N) irrégulière rugueuse, (O) parallèle rugueuse, (P) verruqueuse, (Q) verruqueuse, (S) épineuse, (T), poilue (Qinyuan *et al.*, 2016).



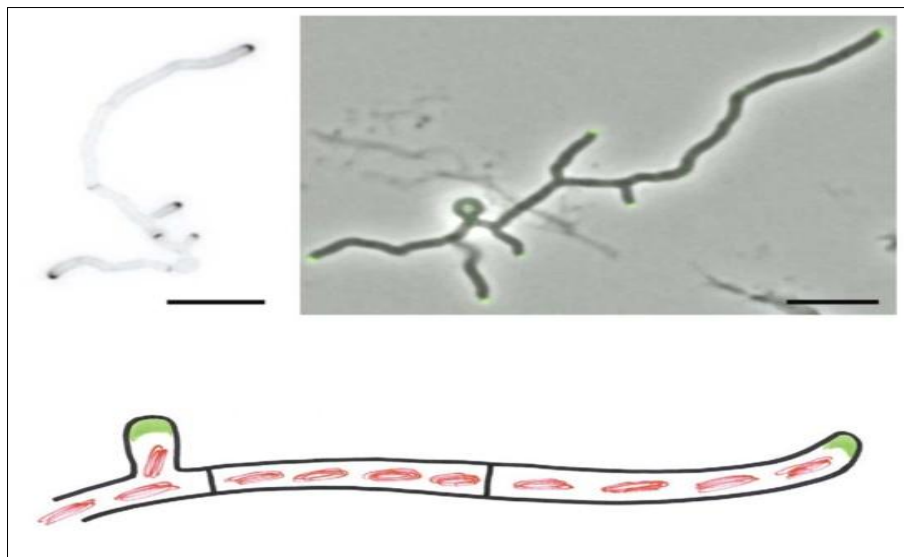
**Figure 5.** Les types de flagellation. (A) Micrographie électronique à balayage de *Kineococcus radiotolerans* SRS30216T SEM d'une cellule mobile de la souche SRS30216T présentant un seul flagelle. Bar, 2  $\mu$ m. (Phillips *et al.*, 2002) (B) Micrographie électronique de *Catenuloplanes japonicus* NBRC 14176T. De nombreux flagelles sont répartis sur toute la spore. (C) *Actinoplanes regularis* A11079. Les sporangiospores sont mobiles par une touffe de flagelles polaires (Qinyuan *et al.*, 2016).

### 1-3-2 Mécanismes moléculaires de la différenciation morphologique

Le mécanisme de croissance cellulaire, des actinobactéries diffèrent considérablement de celui des champignons. Les champignons possèdent des organites subcellulaires et des structures cytosquelettiques dirigeant la croissance tandis que les actinobactéries n'ont pas cette organisation cellulaire. Les deux microorganismes se ressemblent du point de vue morphologies, schémas de croissance, cinétique de croissance hyphale et mycélienne. Ce sont

des mécanismes moléculaires de différenciation morphologique très similaires (Prosser et Tough , 1991).

Le cycle de développement des actinobactéries est particulièrement complexe. Il implique un développement multicellulaire coordonné avec une différenciation physiologique et morphologique de plusieurs types de cellules. Il aboutie à la production de métabolites secondaires et à la dispersion de spores matures (McCorvick et Flårdh, 2012; Flårdh et Buttner, 2009).



**Figure 6.** Croissance apicale chez *Streptomyces* (Flårdh, 2003).

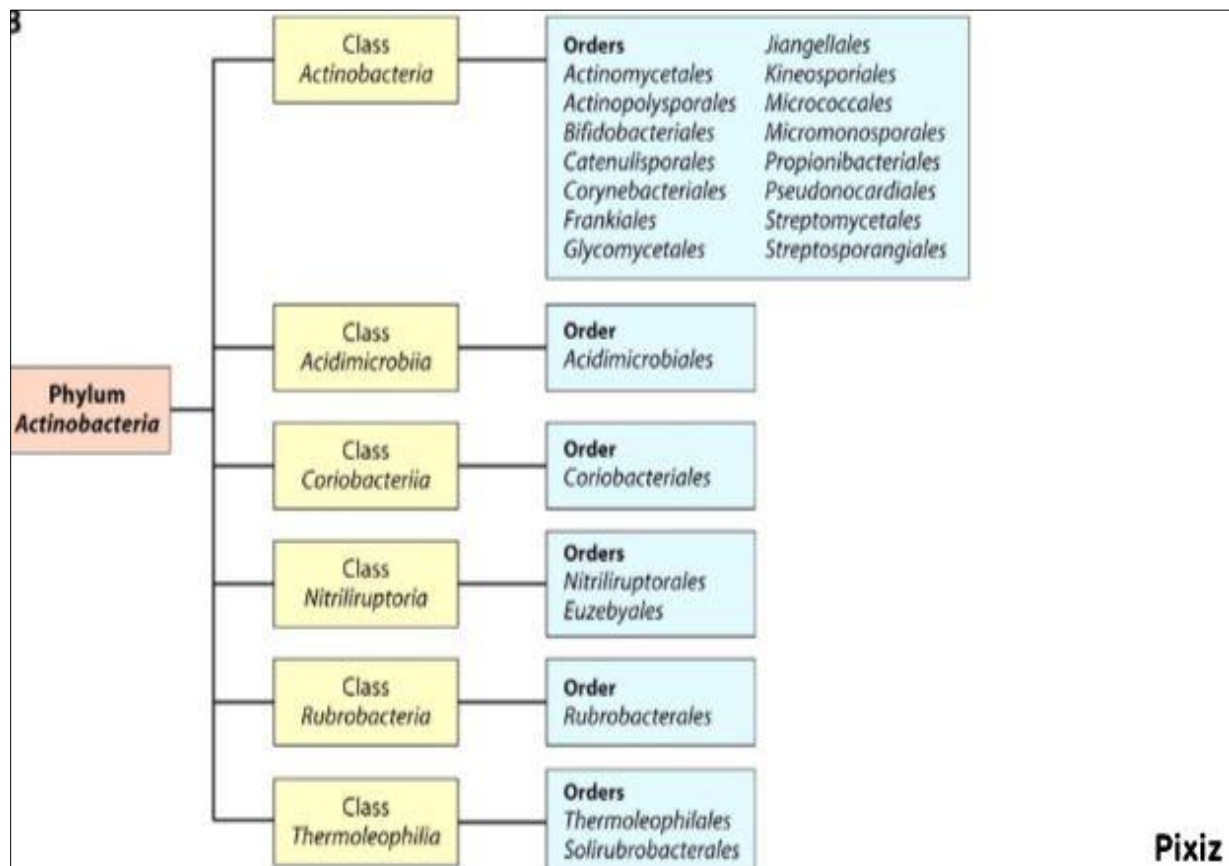
La croissance des actinomycètes provient de l'hyphes, qui est similaire aux champignons filamenteux (Xiang et Morris, 1999). En utilisant la microscopie à fluorescence, une croissance des hyphes apicaux de *Streptomyces* a été observée (**Figure 6**) (Flårdh, 2003). En général, lorsque les nutriments deviennent limités, un changement de développement se produit au cours duquel les hyphes commencent à s'échapper de l'environnement humide et à se développer dans l'air. Ces hyphes aériens peuvent se différencier davantage en longues chaînes de spores, qui peuvent résister aux conditions défavorables.

#### **1-4 Taxonomie et critères d'identification des actinobactéries**

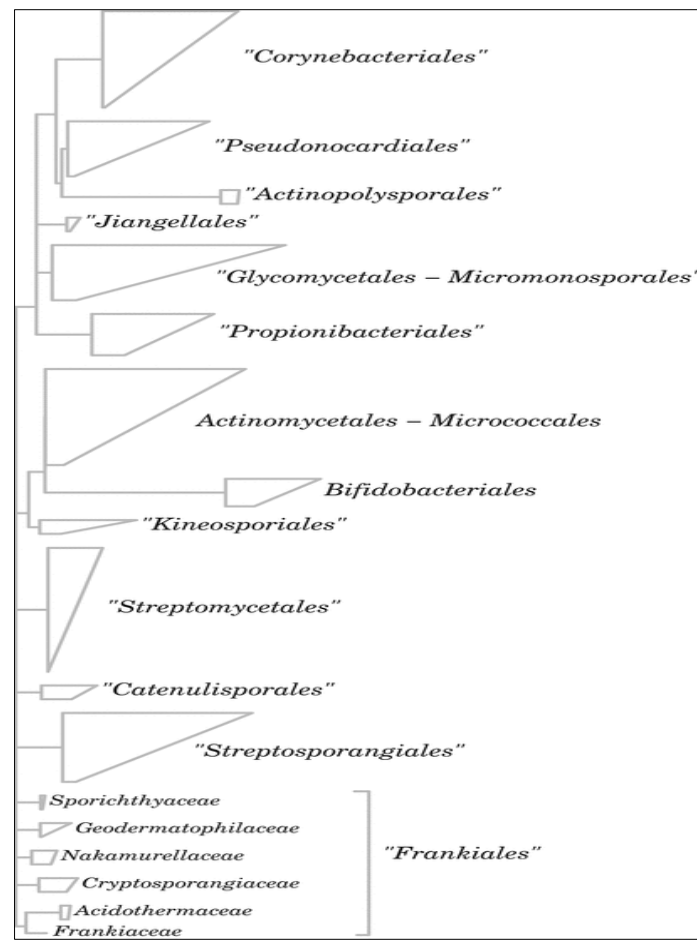
Les actinobactéries représentent l'une des plus grandes unités taxonomiques parmi les 18 principales lignées reconnues dans le domaine des bactéries, dont 5 sous-classes, 6 ordres et 14 sous-ordres (Ludwig *et al.*, 2012). Les genres de ce phylum présentent une énorme diversité en termes de morphologie, de physiologie et de capacités métaboliques. La taxonomie des actinobactéries a évolué de manière significative au fil du temps avec

l'accumulation de connaissances. L'ordre *Actinomycetales*, établi par Buchanan en 1917, appartient à ce groupe d'organismes procaryotes (Buchanan., 1917). Le phylum *Actinobacteria* est délimité sur la base de sa position de ramification dans les arbres génétiques de l'ARNr 16S. Une taxonomie mise à jour des phylum *Actinobacteria* qui est basée sur des arbres d'ARNr 16S a été rapportée (Ludwig *et al.*, 2012). Cette mise à jour a éliminé les rangs taxonomiques des sous-classes et sous-ordres, élevant les anciennes sous-classes et sous-ordres aux rangs des classes et des ordres, respectivement (**Figure 7**) (Gao et Gupta., 2012). Le phylum est ainsi divisé en six classes: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* et *Thermoleophilia*.

La classe *Actinobacteria* contient 15 ordres (**Figure 8**), y compris les deux ordres précédemment proposés, *Actinomycetales* et *Bifidobacteriales* (Zhi *et al.*, 2009). L'ordre *Actinomycetales* est désormais limité aux membres de la famille Actinomycetaceae, et les autres sous-ordres qui faisaient auparavant partie de cet ordre sont désormais désignés sous un ordre distinct (Gao et Gupta., 2012). Par conséquent, 43 des 53 familles du phylum *Actinobacteria* sont affectées à une seule classe *Actinobacteria*, alors que les cinq autres classes ne contiennent ensemble que 10 familles (Goodfellow *et al.*, 2012).



**Figure 7.** Taxonomie proposée pour les actinobactéries dans Bergey Manual de bactériologie systématique (Ludwig *et al.*, 2012 ; Gao et Gupta ., 2012).



**Figure 8.** Ordres de la classe *Actinobacteria* basées sur l'analyse les gènes de l'ARNr 16S. (Goodfellow *et al.*, 2012 in Bergey's Manual, 2012).

#### 1-4-1 Classification morphologique

Les actinobactéries sont actuellement caractérisées en utilisant l'approche polyphasique qui rassemble une variété de données phénotypiques, chimiotaxonomiques et génotypiques qui comprennent la description formelle d'un nouveau taxon. Les éléments clés qui devraient être obtenu et analysés dans les études de systématique des procaryotes ont été établis et mis au point (Kirby, 2011). Les caractéristiques phénotypiques deviennent le fondement de la description des taxons de ces bactéries. La plupart des actinobactéries sont caractérisées et classées en fonction de leur morphologie en premier lieu. Les caractéristiques morphologiques restent parmi les indices les plus essentiels qui fournissent des informations approfondies sur un taxon.

Les principales caractéristiques utilisées pour délimiter la taxonomie des actinobactéries au niveau du genre et de l'espèce sont la morphologie microscopique et la chimiotaxonomie. Cette dernière concerne surtout la composition de la paroi cellulaire et la distribution du sucre

dans la cellule entière. La composition en phospholipides et le type de ménaquinone doivent également pris en compte (Labeda., 1987).

La fragmentation mycélienne peut être considérée comme une forme spéciale de reproduction végétative. Cependant, les actinobactéries dont le mode de vie est principalement mycélien se reproduisent généralement en formant des spores asexuées. Les actinobactéries sont très différents du point de vue morphologie. Il s'agit surtout de la présence ou l'absence d'un mycélium du substrat ou mycélium aérien, la couleur du mycélium, la production de pigments mélanoides diffusibles et la structure et l'apparence de leurs spores.

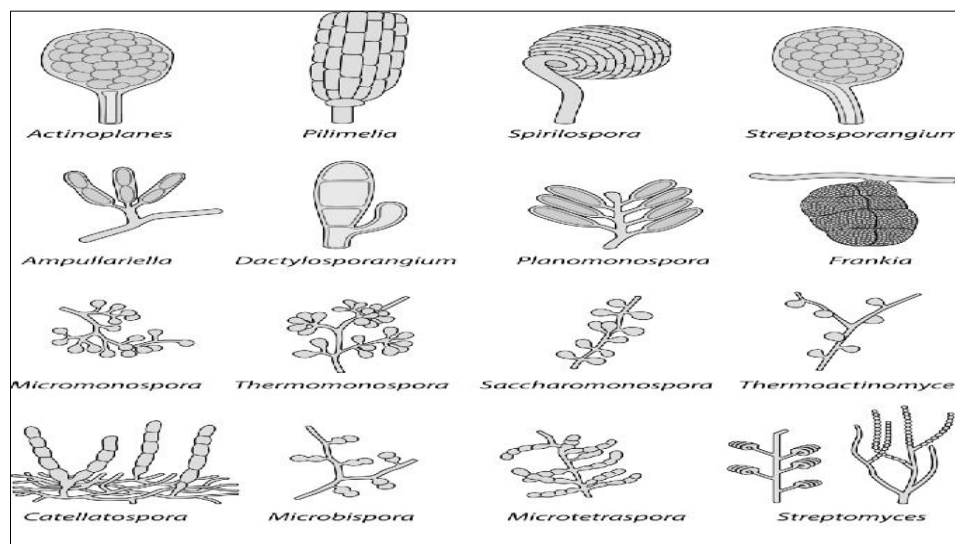
#### **a- Morphologie mycélienne**

À l'exception de *Sporichthya sp.*, qui produit des hyphes aériens qui sont initiés à la surface du milieu par des crampons, les Actinobactéries forment un mycélium de substrat dans les cultures submergées et solides. Cependant, sur des surfaces solides, beaucoup forment des hyphes aériens, qui peuvent contenir des spores reproductrices (Flärdh et Buttner., 2009; van Dissel *et al.*, 2014). Le mycélium de substrat se développe à partir de l'excroissance d'une spore en germination. Le mycélium du substrat ramifié est souvent monopodial, mais dans de rares cas, les actinobactéries, telles que *Thermoactinomyces*, présentent une ramification dichotomique (Kalakoutskii et Agre., 1976). En revanche, les membres de la famille des Micromonosporaceae produisent un mycélium de substrat étendu avec un mycélium aérien absent ou rudimentaire.

Les actinobactéries présentent une grande variété de morphologies, y compris les coccoïdes (*Micrococcus*), les bâtonnets-coccoïdes (*Arthrobacter*), des formes hyphales fragmentées (*Nocardia spp.*), des formes avec des mycéliums ramifiés permanents et très différenciés (*Streptomyces spp.*, *Frankia*) (Atlas., 1997). Les rhodocoques forment des filaments allongés sur le substrat et ne produisent pas de véritable mycélium (Locci et Schaal., 1980), tandis que les corynébactéries sont dépourvus de mycélium. Cependant, comme dans d'autres actinobactéries, les filaments se développent à l'apex plutôt que par extension de paroi latérale (Flärdh., 2003, Letek *et al.*, 2008). Les actinobactéries appartenant au genre *Oerskovia* sont caractérisées par la formation des mycéliums de substrat ramifiés qui se décomposent en éléments mobiles flagellés (Prauser *et al.*, 1970). De plus, les mycobactéries et les rhodocoques ne forment généralement pas de mycéliums aériens, bien qu'il existe certaines exceptions (Ochi., 1995).

### b- Morphologie de la chaîne des spores

Les spores sont extrêmement importantes dans la taxonomie des actinobactéries (Locci et Sharples., 1984). Ils peuvent se former sur le mycélium de substrat et / ou sur le mycélium aérien sous forme de cellules uniques ou en chaînes de différentes longueurs. Dans d'autres cas, les spores peuvent être hébergées dans des vésicules spéciales (sporangies) dotées ou non de flagelles. Ainsi, dans les genres *Micromonospora*, *Micropolyspora* et *Thermoactinomyces*, la formation de spores se produit directement sur le mycélium de substrat (Cross et Goodfellow, 1973), tandis que chez *Streptomyces* les spores se développent à partir du mycélium aérien. Les groupes *Actinoplanes* et *Actinosynnema* sont caractérisés par des spores mobiles, tandis que *Thermoactinomyces* possède des endospores thermorésistantes uniques (Cross et Goodfellow, 1973). Certains autres genres d'actinobactéries ont des sclérotés (*Chainia*), des synnèmes (*Actinosynnema*), des vésicules contenant des spores (*Frankia*) ou des vésicules dépourvues de spores (*Intrasporangium*). D'autres genres, tels qu'*Actinoplanes*, *Ampulariella*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Dactylosporangium* et *Streptosporangium*, sont classés en fonction de la morphologie de leurs spores. La **Figure 9** illustre les différents types de spores que l'on peut trouver dans les genres actinomycétaux. Enfin, la morphologie des spores elles-mêmes peut également être utilisée pour caractériser les espèces: elles peuvent avoir des surfaces lisses, verruqueuses, épineuses, velues ou rugueuses (Dietz et Mathews., 1971) (**Figure 9**).



**Figure 9.** Différents types de chaînes de spores produites par les actinobactéries (Barka *et al.*, 2016).



### c- Longueur de chaîne de spores

Le nombre de spores par chaîne de spores varie considérablement d'un genre à l'autre. Les genres *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* et *Promicromonospora* produisent des spores isolées, tandis que *Microbispora* produit des spores en paires longitudinales. Les membres des genres *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya* et certains *Nocardia spp.* ont des chaînes de spores courtes, tandis que les membres des genres *Streptomyces*, *Nocardioïdes*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* et certains *Nocardia spp.*, produisent de très longues chaînes contenant jusqu'à 100 spores. En revanche, les espèces de *Frankia* produisent des sporanges. Les chaînes de spores des streptomycètes peuvent être classées comme étant droites à flexueuses (Rectus-Flexibilis), à boucles ouvertes (Relinaculam Apertum), à spirales ouvertes ou fermées (spira) ou verticillées (Pridham *et al.*, 1958).

### d- Pigments mélanoides

Les mélanines sont des polymères ayant diverses structures moléculaires qui apparaissent généralement noires ou brunes et sont formées par la polymérisation oxydative de composés phénoliques et indoliques. Ils sont produits par un large éventail d'organismes, allant des bactéries aux humains. Les actinobactéries sont connues depuis longtemps pour produire des pigments, qui peuvent être rouges, jaunes, orange, roses, brunâtres, bruns, brun verdâtre, bleus ou noirs, selon la souche, le milieu utilisé et l'âge de la culture (Lechevalier et Lechevalier., 1965). Généralement appelés mélanines ou pigments mélanoides, ces polymères métaboliques brun-noir. Ils sont importants non seulement en raison de leur utilité dans les études taxonomiques mais aussi en raison de leur similitude avec les substances humiques du sol (Dastager *et al.*, 2006; Manivasagan *et al.*, 2013). Les mélanines ne sont pas essentielles à la croissance et au développement de ces microorganismes, mais elles jouent un rôle crucial dans l'amélioration de leur survie et de leur compétitivité.

### 1-4-2 Classification chimiotaxonomique

La chimiotaxonomie est l'utilisation de la distribution des composants chimiques des organismes pour les grouper selon les similitudes de leurs chimies cellulaires (Goodfellow et Minnikin, 1985; O'Donnell, 1988). Les composants chimiques les plus couramment utilisés dans cette systématique sont les acides aminés de la paroi cellulaire, les lipides, les protéines, les ménaquinones, les types d'acide muramique, les sucres et la composition de base de l'ADN

(Goodfellow et O'Donnell, 1989, Williams *et al.*, 1989). La classification et l'identification chimiotaxonomiques peuvent également être effectuées sur la base d'informations dérivées des techniques de prise d'empreintes chimiques de l'organisme entier. Plusieurs marqueurs chimiotaxonomiques ont été signalés comme étant d'une valeur particulière pour la classification et l'identification des actinobactéries (Ludwig *et al.*, 2012).

L'analyse de la composition de la paroi cellulaire des actinobactéries a une valeur taxonomique car elle diffère entre les sous-ordres (Berd, 1973). En particulier, les informations sur l'architecture chimique du peptidoglycane dans la paroi cellulaire sont précieuses pour classer les actinomycètes car elles facilitent la discrimination entre les groupes d'actinobactéries au-delà du genre. De multiples caractéristiques discriminatives concernant la structure et la composition de leurs peptidoglycanes ont été identifiées (Willey *et al.*, 2010), notamment l'identité de l'acide aminé en position 3 de la chaîne latérale tétrapeptide, la présence ou l'absence de glycine dans les ponts interpeptidiques et la teneur en sucre du peptidoglycane (Willey *et al.*, 2010). La présence ou l'absence d'isomères optiques spécifiques de l'acide aminé non protéinogène chiral 2,6-diaminopimélique (DAP) est une autre caractéristique chimiotaxonomiquement importante des parois cellulaires des bactéries à Gram-positif. Le peptidoglycane des actinobactéries peut contenir des *LL*- ou *DL*-(*méso*)-DAP, selon le genre. En considérant l'isomérisation DAP et la présence/absence d'autres acides aminés et (amino) sucres, Lechevalier et Lechevalier ont identifié neuf chémotypes distincts de parois cellulaires actinobactériennes (Lechevalier et Lechevalier, 1980), (**Tableau 1**). Cependant, il est important de réaliser que si l'analyse DAP et d'autres méthodes chimiotaxonomiques sont extrêmement importantes dans la taxonomie des actinobactéries, divers groupes partagent le même profil DAP. Par exemple, les genres *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Arachnia* et *Nocardioides* partagent le même chémotype (chémotype I), même si leurs morphologies est différentes. Par conséquent, lors de l'évaluation de la diversité phénotypique des actinobactéries, le profilage DAP doit être utilisé en combinaison avec d'autres critères phénotypiques ou génotypiques (Bouizgarne et Ait Ben Aoumar, 2014). À cette fin, un système de classification des actinobactéries basé sur les caractéristiques morphologiques et chimiques a été proposé (Lechevalier et Lechevalier, 1965).

Les profils d'acides gras cellulaires sont également des indicateurs chimiotaxonomiques très utiles pour l'identification de genres spécifiques d'actinobactéries (Kroppenstedt, 1985). La longueur des chaînes des acides gras bactériens varie de deux (C<sub>2</sub>) à plus de 90 (C<sub>90</sub>) atomes de carbone, mais seuls ceux dans la gamme C<sub>10</sub> à C<sub>24</sub> ont une valeur taxonomique particulière (Suzuki *et al.*, 1993). Trois principaux types de profils d'acides gras ont été

identifiés chez les actinobactéries (Kroppenstedt, 1985). Plusieurs types de quinones isoprénoïdes ont été caractérisés dans les bactéries (Collins *et al.*, 1985). Les ménaquinones se trouvent le plus souvent dans les enveloppes de cellules d'actinobactéries (Kroppenstedt, 1985; Collins, 1994). L'analyse des ménaquinones a fourni des informations précieuses pour la classification des souches *Actinomadura*, *Microtetraspora* et *Streptomyces* (Kroppenstedt, 1985, Collins *et al.*, 1988 ; Yamada *et al.*, 1982). Ainsi, les ménaquinones cycliques sont caractéristiques des membres du genre *Nocardia* (Goodfellow, 1992; Tindall *et al.*, 2006), tandis que des ménaquinones cycliques entièrement saturées ont été signalées pour *Pyrobaculum organotrophum* (Tindall *et al.*, 2006).

Différents types de phospholipides sont distribués de façon discontinue dans les membranes cytoplasmiques des actinobactéries. Ils fournissent des informations utiles pour la classification et l'identification des genres d'actinobactéries (Williams *et al.*, 1989, Goodfellow, 1989). Les actinobactéries ont été classées en cinq groupes de phospholipides sur la base d'analyses semi-quantitatives des principaux marqueurs des phospholipides trouvés dans des extraits d'organismes entiers (Lechevalier, 1977; Lechevalier *et al.*, 1981). Ce système de classification a été utilisé pour identifier *Aeromicrobium* (Yokota et Tamura, 1994) et *Dietzia* (Rainey *et al.*, 1995). Il est important de noter que des membres du même genre chez les actinobactéries ont le même type de phospholipides.

Enfin, l'analyse de la composition du sucre est également importante en chimiotaxonomie. Au niveau supragénérique, les sucres neutres (les principaux constituants des enveloppes cellulaires d'actinobactéries) sont des marqueurs taxonomiques utiles (**Tableau 2**). Sur la base de la distribution discontinue des principaux sucres diagnostiques, les actinobactéries peuvent être divisés en cinq groupes. Le groupe A comprend les espèces dont les parois cellulaires contiennent de l'arabinose et du galactose. Les parois cellulaires du groupe B contiennent du madurose (3-*O*-méthyl-*D*-galactose): Le groupe C comprend les sucres non-identifiés. Les parois cellulaires du groupe D contiennent de l'arabinose et le xylose: Les parois cellulaires du groupe E contiennent du galactose et du rhamnose (Labeda, 1987; Lechevalier et Lechevalier, 1970). De plus, la présence de 3'-*O*-méthyl-rhamnose dans *Catellatospora* (Asano *et al.*, 1989) et de tyvelose dans *Agromyces* (Maltsev *et al.*, 1992) a été précieuse pour la classification de certains taxons d'actinobactéries.

**Tableau 1** : Différents types des composants de la paroi cellulaire des actinobactéries (Lechevalier et Lechevalier, 1970; Murray *et al.*, 1989; Wellington *et al.*, 1992; Bouizgarne et Ait Ben Aoumar, 2014).

Type de paroi cellulaire	Constituant (s) pariétal majeur (s)	Genre
I	LL-DAP, glycine, absence de sucre	<i>Arachnia, Nocardioides, Pimelobacter, Streptomyces</i>
II	<i>meso</i> -DAP, glycine, arabinose, xylose	<i>Actinomyces, Actinoplanes, Ampulariella, Catellatosporia, Dactylosporangium, Glycomyces, Micromonospora, Pilimelia</i>
III	<i>meso</i> -DAP, madurose (3- <i>O</i> -methyl-Dgalactose)	<i>Actinocorallia, Actinomadura, Dermatophylus, Frankia, Geodermatophilus, Kitasatospora, Maduromyces, Microbispora, Microtetrastpora, Nonomuraea, Planobispora, Planomonospora, Planotetrastpora</i> , quelques <i>Frankia</i> spp., <i>Spirillosporia, Streptosporangium, Thermoactinomyces, Thermomonospora</i>
IV	<i>meso</i> -DAP, arabinose, galactose	<i>Micropolyspora, Nocardioforms</i>
V	Absence de DAP; présence de lysine et ornithine	<i>Actinomyces</i>
VI	Absence de DAP; présence variable d'acide aspartique, galactose	<i>Arcanobacterium, Actinomyces, Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora</i>
VII	Absence de DAP; acide diamino-butérique, glycine, avec lysine variable	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
VIII	Absence de DAP; ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

**Tableau 2 :** Marqueurs taxonomiques utilisés pour différencier les genres d'actinobactéries (Barka *et al.*, 2016).

acide Aminé présent	Sucres	Caractéristiques morphologiques	Genres
Absence d'acide diaminopimelique	Xylose, madurose	Mycélium de substrat, se brise en éléments mobiles Mycélium aérien stérile, se brise en éléments non mobiles Sporanges à spores mobiles Chaînes courtes de conidies sur le mycélium aérien	<i>Oerskovia</i> <i>Promicromonospora</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Actinomadura</i>
L- acide diaminopimelique	Xylose, madurose	Mycéliums aérien et de substrat qui se décomposent en bâtonnets et éléments coccoïdes Uniquement le mycélium de substrat, portant des vésicules terminales ou subterminales Mycélium aérien à longues chaînes de spores Chaînes très courtes de grosses conidies sur le mycélium végétatif et aérien Sclérotés Verticilles de petites chaînes de spores Absence de mycélium aérien, sporanges sur le mycélium végétatif	<i>Nocardioïdes</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Streptomyces</i> , <i>Kitasatospora</i> <i>Streptomyces</i> <i>Streptomyces</i> <i>Streptoverticillium</i> <i>Kineosporia</i>
meso- acide diaminopimelique	Xylose, arabinose	Conidies isolées sur le mycélium végétatif Absence de sporanges, chaînes courtes de conidies Chaînes de conidies sur le mycélium aérien Sporanges oligosporiques dactyloïdes, spores mobiles Sporanges avec spores sphériques et mobiles formées à la surface des colonies Sporanges à spores en forme de bâtonnets, motilité via flagelles polaires Sporanges à spores latérales flagellées Sporanges multiloculaires, les spores ne sont pas mobiles	<i>Micromonospora</i> <i>Cattellatospora</i> <i>Glycomyces</i> <i>Dactylosporangium</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Ampullariella</i> <i>Pilimelia</i> <i>Frankia</i>
		Madurose	Chaînes courtes de conidies sur le mycélium aérien Chaînes de conidies à spores Chaînes de conidies avec 2 à 6 spores Sporanges avec 2 spores mobiles Sporanges avec 1 spore mobile Mycélium à sporanges sphériques contenant de nombreuses spores mobiles en forme de bâtonnets
	Fructose	Sporanges multiloculaires Sporanges avec spores mobiles	<i>Frankia</i> <i>Actinoplanes</i>
	Rhamnose,	Substrat et mycélium aérien qui se	<i>Saccharothrix</i>

	galactose	brisent en éléments non mobiles	
	Rhamnose, galactose, mannos	Identique à <i>Streptomyces</i>	<i>Streptoalloteichus</i>
	Galactose	Identique à <i>Streptomyces</i>	<i>Kitasatospora</i>
	Arabinose, galactose	Présence d'acide nocardiomycolique (NMA) dans les cellules entières; substrat et fragment de mycélium aérien en bâtonnets et éléments coccoïdes Présence de NMA; bâtonnets et substrat largement ramifié mycélium qui se fragmente en bâtonnets irréguliers et cocci Présence de NMA; les tiges droites à légèrement incurvées se produisent individuellement, en paires ou en masses; les cellules sont non mobiles, non sporulées et ne produisent pas d'hyphes aériens Présence de NMA; spores appariées portées en paires longitudinales sur les hyphes végétatifs; le mycélium aérien est clairsemé Absence de NMA, les spores sont longues, cylindriques sur le mycélium aérien, formées par le bourgeonnement Absence de NMA; longues chaînes de conidies sur mycélium aérien Absence de NMA; mycélium aérien portant de longues chaînes de conidies; halophile Absence de NMA; le mycélium du substrat a tendance à se briser en éléments non mobiles; des hyphes aériens peuvent se former et peuvent également segmenter Absence de NMA; Mycélium aérien portant des hyphes recourbées intégrées dans une matrice amorphe Absence de NMA; Mycélium aérien et substrat portant de longues chaînes de spores mobiles Absence de NMA; le mycélium aérien a tendance à se fragmenter en bâtonnets et cocci, courtes chaînes de spores Les spores formées ne sont pas résistantes à la chaleur Longues chaînes de spores sur le mycélium aérien Structures hyphales colonnes appelées synnèmes portant des chaînes de conidies capables de former des flagelles Sporanges multiloculaires contenant des spores mobiles	<i>Nocardia</i>  <i>Rhodococcus</i>  <i>Tsakamurella</i>  <i>Actinobispora</i>  <i>Pseudonocardia</i>  <i>Saccharomonospora</i>  <i>Actinopolyspora</i>  <i>Amycolata,</i> <i>Amycolatopsis</i>  <i>Kibdelosporangium</i>  <i>Aktinokineospora</i>  <i>Pseudoamycolata</i>  <i>Thermomonospora</i>  <i>Nocardiopsis</i>  <i>Actinosynnema</i>  <i>Geodermatophilus</i>

### 1-4-3 Classification moléculaire

Plus récemment, la classification morphologique et chimique des actinobactéries a été contestée par les données taxonomiques moléculaires, dont une grande partie a été obtenue grâce à l'avancement rapide du séquençage du génome. Notamment, certains organismes placés de manière inappropriée dans certains groupes taxonomiques ont récemment été reclassés sur la base d'analyses moléculaires (Zhi *et al.*, 2009). Un exemple récent est la définition finale de *Kitasatospora* en tant que genre distinct au sein des *Streptomycetaceae* (Girard *et al.*, 2013). Le séquençage du génome a résolu un long débat sur la relation de ce groupe avec le genre *Streptomyces* et a démontré de façon concluante qu'il s'agit en fait d'un genre distinct (Zhang *et al.*, 1997; Girard *et al.*, 2014; Ichikawa *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2004).

À l'heure actuelle, une nouvelle espèce ne peut pas être revendiquée sans analyse génétique basée sur le séquençage du gène ARNr 16S, l'hybridation ADN-ADN et la détermination du pourcentage guanine-cytosine (GC%). Le séquençage du génome de nos jours devient dans certains laboratoires une routine. Des critères de composition moléculaire et chimique ont été utilisés pour grouper l'ordre *Actinomycetales* en 14 sous-ordres: *Actinomycineae*, *Actinopolysporineae*, *Catenulisporineae*, *Corynebacterineae*, *Frankineae*, *Glycomycineae*, *Jiangellineae*, *Kineosporineae*, *Micrococcineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, et *Streptosporangineae* (Euzéby, 1997). De plus, le séquençage des gènes d'ARNr 16S a conduit à la reconnaissance de 39 familles et 130 genres. Tous les groupes précédemment attribués au rang taxonomique «d'ordre» ont été récupérés comme étant strictement monophylétiques sur la base de ces critères moléculaires et chimiques. Certains groupes paraphylétiques ont été trouvés dans le rang «sous-ordre», cela pourrait être dû au fait que la classification était principalement basée sur les arbres de gènes d'ARNr 16S.

#### 1-4-3-1 Séquençage du gène ARNr16S et phylogénie

Le gène ARNr 16S code la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr) est devenue la molécule de choix pour l'attribution des phylogénies microbienne et taxonomiques au niveau du genre. D'ailleurs, des investigations phylogénétiques détaillées des actinobactéries ont jusqu'à présent été réalisées principalement en utilisant des séquences d'ARNr 16S (Stackbrandt *et al.*, 1997; Ludwig et Klenk, 2005; Stackbrandt et Schumann, 2006; Ventura *et*

*al.*, 2007; Zhi *et al.*, 2009; Adekambi *et al.*, 2011; Ludwing *et al.*, 2012). Ce gène est essentiellement utilisé et séquencé en raison de sa structure, très conservée chez tous les procaryotes. En effet, il est constitué d'une succession de domaines conservés, sites de complémentarité pour les amorces universelles utilisées pour le séquençage de ce gène. D'autres portions de séquences propres à un groupe de bactéries, nommées séquences signatures (courtes séquences nucléotidiques conservées, spécifiques d'un groupe d'organisme phylogénétiquement défini) sont utilisées pour définir l'espèce, le genre et la famille). En plus, les banques de données de séquences du gène 16S sont aujourd'hui très développées. L'identification en séquençant le gène ARNr 16S est fiable; les résultats obtenus par séquençage du gène ARNr 16S sont similaires à ceux obtenus avec le génome entier. L'analyse de milliers de séquences d'ARNr a montré qu'aucune paire de microorganismes partageant 98,5% d'identité de leur ARNr 16S n'a jamais présenté moins de 70% d'hybridation ADN/ADN (la valeur seuil qui correspond à la définition opérationnelle d'une espèce microbienne) (Lansing, 2018). D'après Drancourt, Il convient de séquencer au moins 500 à 525 bp, idéalement 1300 à 1500 bp pour s'assurer d'un bon résultat (Drancourt *et al.* 2000). Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) d'homologie : les critères pour l'identification au niveau de l'espèce sont plus de 99 % d'homologie de séquence, idéalement >99,5 %, avec une comparaison à une séquence de souche de référence identifiée par hybridation ADN-ADN (technique de référence). Cependant, il faut noter qu'un taux d'homologie compris entre 79% et 100% n'indique pas nécessairement que l'espèce soit identique à la souche de référence, surtout si cette dernière fait partie d'un genre comptant un grand nombre d'espèces comme c'est le cas pour le genre *Streptomyces*. Le recours à l'hybridation ADN-ADN, ou bien au séquençage du génome total s'avère donc nécessaire pour statuer définitivement sur des cas pareils. Dans ce contexte, Meier-Kolthoff *et al.*, 2013 et Kim *et al.*, 2014, ont proposé 98,2% et 98,65% respectivement entre les espèces et ceux sans avoir recours à l'hybridation ADN-ADN.

#### **1-4-3-2 Hybridation ADN-ADN**

La DDH (DNA-DNA Hybridization) est une technique basée sur une analyse comparative entre l'ADN total de deux espèces bactériennes. Cette méthode basée sur l'ADN est utilisée pour la délimitation des espèces et a été évaluée par un comité ad hoc sur la systématique (Colwell, 1970; Johnson *et al.*, 1970). Elle est considérée comme l'étalon-or pour la classification des espèces bactériennes. La DDH mesure le degré de similitude des séquences de deux ADN et s'avère très utile pour différencier des organismes très proches,



lorsque le séquençage de l'ARNr ne permet pas de conclure. Le principe de cette technique est basé sur la stabilité thermique de l'ADN hybridé de deux organismes étroitement apparentés. La molécule d'ADN peut être dénaturée, mais elle peut également être ramenée à sa conformation native en abaissant la température, connue sous le nom de température de réassociation. Les principaux paramètres qui jouent un rôle important dans cette technique sont : la teneur en G+C %, la force ionique de la solution et la température de fusion ( $T_m$ ) de la molécule d'ADN. La  $T_m$  est le seul paramètre variable parmi ces trois, car d'autres paramètres comme la force ionique peuvent être maintenus constants. Par conséquent, plus est la similitude entre la molécule hétéroduplex, plus est la température requise pour la séparer, c'est-à-dire qu'une valeur  $T_m$  élevée est requise. Si le pourcentage (%) d'hybridation est inférieur à la valeur seuil de 70%, les deux isolats sont considérés comme appartenant à deux espèces distinctes (Wayne *et al.*, 1987). Tandis que des valeurs d'au moins 25% sont nécessaires pour affirmer que deux organismes doivent être placés dans le même genre. À ce jour, plus de 5000 espèces bactériennes ont été efficacement délimitées en utilisant cette technique (Mora, 2006).

#### 1-4-3-3 Pourcentage G+C

La composition de base exprimée en pourcentage molaire guanine+cytosine (% molaire G+C) était la première propriété de l'ADN utilisé à des fins taxonomiques. Cette composition se détermine de plusieurs manières. La plus évidente est le séquençage du génome. Cependant, pour des microorganismes dont le génome n'a pas encore été séquencé, le contenu en G+C est souvent déterminé par dénaturation thermique de l'ADN à partir de la température de fusion ( $T_m$  pour melting temperature) de l'ADN. L'ADN des microorganismes varie fortement dans son contenu en G+C. le contenu en G+C des souches à l'intérieur d'une espèce particulière est constant et varie très peu à l'intérieur d'un genre. Dans le règne bactérien le contenu en G+C varie de 25% à 75%.

Les organismes étroitement apparentés ont des profils GC assez similaires, et les groupes apparentés sur le plan taxonomique ne diffèrent qu'entre 3% et 5% (Tiedje *et al.*, 1999). Il faut noter que, c'est seulement si deux microorganismes se rassemblent phénotypiquement qu'un contenu en G+C similaires suggère une parenté étroite, car deux séquences très différentes peuvent être construite avec les mêmes proportions de paires de bases. Tandis que, si deux organismes différents de plus de 10% dans leur contenu en G+C, leurs génomes ont des séquences en bases très différentes, ce qui indique qu'ils n'ont pas une parenté proche. Les avantages de l'analyse G+C sont qu'elle n'est pas influencée par les biais de la PCR, qu'elle

inclut tout l'ADN extrait, qu'elle est quantitative et qu'elle peut découvrir des membres rares des populations microbiennes (Lansing, 2018).

Le phylum *Actinobacteria* comprend des bactéries Gram-positives avec une teneur élevée en G+C dans leur ADN, allant de 51% dans certaines corynébactéries à plus de 70% dans *Streptomyces* et *Frankia*. Une exception à cela est le génome du pathogène obligatoire *Tropheryma whippelii*, avec moins de 50% de G+C (Ventura *et al.*, 2007).

#### 1-4-4 Taxonomie polyphasique

L'histoire de la classification des procaryotes montre clairement que les changements ont été causés par la disponibilité de nouvelles techniques (Schleifer, 2009). Le développement de la classification procaryote a connu différentes étapes:

- (i) Une classification classique ou traditionnelle basée principalement sur les caractéristiques morphologiques microbiennes, les exigences de croissance, les caractéristiques physiologiques et biochimiques (Buchanan, 1955);
- (ii) Une taxonomie numérique analysant d'énormes volumes de données phénotypiques pour dériver des relations significatives entre un grand nombre de micro-organismes peut être réalisée à l'aide de programmes informatiques (Sneath et Sokal, 1962; Sneath, 1984);
- (iii) Des méthodes chimiotaxonomiques ont étudié la variation chimique des actinobactéries et utilisé des caractères chimiques dans la classification et l'identification, et elles ont traité de la distribution discontinue de produits chimiques spécifiques, en particulier des acides aminés, des lipides, des sucres, des protéines et d'autres substances dans des cellules entières, des parties de cellules ou produits de fermentation, et avec des enzymes (Goodfellow et O'Donnell, 1993; Kämpfer, 1998);
- (iv) Une classification génotypique basée sur la parenté génétique, déduite principalement de l'hybridation ADN-ADN (DDH) et des analyses de séquences comparatives de macromolécules homologues, en particulier, d'ARNr (Goris *et al.*, 2007; Stackebrandt et Goebel, 1994).

Ces dernières années, de plus en plus d'approches génotypiques ont été appliquées à la classification des actinobactéries, telles que les analyses de séquence multilocus (MLSA) (Serrano, 2010), l'identité nucléotidique moyenne (ANI) (Rosselló-Mora, 2005; Kim *et al.*, 2014) et l'analyse du génome entier (Rosselló-Mora, 2005; Meier-Kolthoff *et al.*,

2014; Chun et Rainey, 2014). Récemment, le système le plus largement accepté est l'approche polyphasique (Vandamme *et al.*, 1996). Cette approche combine autant de données différentes que possible, par exemple, des informations phénotypiques, chimiotaxonomiques, génotypiques et phylogénétiques. La méthode de classification moderne est un moyen important de comprendre l'origine biologique et la diversité des espèces. D'une part, les résultats de la détermination quantitative sont plus objectifs; d'autre part, les résultats de recherche de la taxonomie polyphasique enrichissent non seulement considérablement le contenu taxonomique, mais enrichissent également l'essence du phénomène de la vie. Mais la caractérisation d'une souche est un élément clé de la systématique des actinobactéries à toutes les époques et les morphologies procaryotes sont cohérentes avec leurs reconstructions phylogénétiques (Xu *et al.*, 2007; Rosselló-Mora et Amann, 2001).

### **1-4-5 Taxonomie numérique**

La taxonomie numérique implique d'examiner de nombreuses souches pour un grand nombre de caractères avant d'affecter l'organisme de test à un cluster basé sur des caractéristiques partagées. Les taxons définis numériquement sont polythétiques; ainsi, aucune propriété n'est ni indispensable ni suffisante pour autoriser un organisme à faire partie d'un groupe. La taxonomie numérique a été appliquée pour la première fois à *Streptomyces* par Silvestri *et al.* (1962). L'étude taxonomique numérique du genre *Streptomyces* par Williams *et al.* (1983) implique la détermination de 139 caractères unitaires pour 394 cultures de type *Streptomyces*. La classification numérique du genre *Streptomyces* par Kampfner *et al.* (1991) implique la détermination de 329 tests physiologiques. La taxonomie numérique nous fournit un cadre précieux pour la taxonomie de *Streptomyces*, y compris l'identification des espèces.

Les tests physiologiques impliqués sont en général des tests de dégradation des composés organiques, tests de résistance aux différents agents chimiques, ainsi que la tolérance aux différents facteurs physiologiques (pH, température, salinité, etc).

## Chapitre 2 : Valorisation des actinobactéries thermo-tolérants et thermophiles

### 2-1 Définition

Les actinobactéries thermophiles se développent à des températures relativement élevées allant de 40 à 80 °C (Tortora *et al.*, 2007). Ils sont répandus dans le foin moisi (Corbaz *et al.*, 1963), les résidus végétaux auto-chauffants, les céréales, la bagasse de canne à sucre (Suihko *et al.*, 2006), les matières végétales en décomposition et les tas de compost (Henssen et Schnepf, 1967). Plus récemment, ils ont été isolés des sols désertiques, des sources chaudes, des éruptions volcaniques et des déchets industriels thermiques (Agarwal et Mathur, 2017). Les bactéries thermophiles se présentent sous deux grandes catégories: actinobactéries strictement thermophiles et modérément thermophiles. Le premier groupe peut croître à des températures comprises entre 37 et 65 °C, avec un optimum entre 55 et 60 °C. Les actinobactéries modérément thermophiles se développent entre 28 à 60 °C et nécessitent 45–55 °C pour une croissance optimale (Jiang et Xu, 1993). Quand aux actinobactéries thermotolérantes, ils peuvent survivent à des températures allant jusqu'à 50 °C (Lengeler *et al.*, 1999).

### 2-2 Caractéristiques

La totalité des actinobactéries thermophiles et thermotolérantes, à l'exception des genres (*Amycolatopsis*, *Rubrobacter*, *Ferrithrix*, *Acidothermus*, *Aciditerrimonas*, *Acidimicrobium* et *Thermoleophilum*) sont des producteurs de spores. La plupart du temps, ils sont non acido-résistants, non mobiles et aérobies, sauf le genre *Amycolatopsis* qui comprend à la fois les aérobies et les anaérobies facultatifs. Tous sont à Gram-positif, à l'exception de *Thermoleophilum sp.*, *Ferrithrix sp.* et l'espèce (*S. viridis*) du genre *Saccharomonospora*.

Le statut exact des actinobactéries thermophiles n'a été validé qu'après l'avènement de la taxonomie polyphasique. La composition de la paroi cellulaire (peptidoglycane) est l'un des principaux critères de leur classification spécifique du genre. La majorité des actinobactéries thermophiles ont une paroi cellulaire de type III, tandis que quelques genres (*Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* et *Amycolatopsis*) sont connus pour contenir une paroi cellulaire de type IV. Une seule espèce du genre *Streptomyces* possède une paroi cellulaire de type I.

Les autres composants cellulaires pris en compte pour la classification chimiotaxonomique comprennent les phospholipides, les acides gras, l'acide mycolique, le type de ménaquinones et la teneur en GC (% mol). Les principales ménaquinones

respiratoires des actinobactéries thermophiles et thermotolérantes sont les variantes MK-9. La présence d'autres ménaquinones MK-8 (*Rubrobacter*) et MK-10 (*Thermobifida*) a également été signalée (Goodfellow *et al.*, 2012) chez les actinobactéries thermophiles. Plusieurs actinobactéries thermophiles et thermotolérantes sont décrits dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3 :** Espèces actinobactériennes thermophiles et thermotolérantes (Shivlata et Satyanarayana, 2015).

Actinobacteries	Conditions de croissance		Echantillon	Références
	Température(°C)	pH		
<i>Microbispora siamensis</i> DMKUA 245 <sup>T</sup>	25–50	ND*	Échantillon de sol, Thaïlande	Boondaeng <i>et al.</i> , 2009
<i>Georgenia sediminis</i> SCSIO 15020 <sup>T</sup>	24–60	6–10	Sédiments marins, Autriche	You <i>et al.</i> , 2013
<i>Actinokineospora soli</i> YIM 75948 <sup>T</sup>	25–55	7–9	Échantillon de sol, Chine	Tang <i>et al.</i> , 2012
<i>Marinactinosporathermotolerans</i> SCSIO 00652 <sup>T</sup>	10–55	6–9	Sédiments marins, Chine	Tian <i>et al.</i> , 2009
<i>Saccharomonospora viridis</i> SJ-21	35–60	7–10	Source d'eau chaude, Inde	Jani <i>et al.</i> , 2012
<i>Actinomadura miaoliensis</i> BC 44T-5 <sup>T</sup>	22–55	7.0	Échantillon de sol, Taiwan	Tseng <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptosporangium</i> sp.	ND	ND	Sol du désert de Mongolie	Kurapova <i>et al.</i> , 2012
<i>Streptomyces Calidiresistens</i> YIM 7808T	40–65	7.0	Sédiments de sources chaudes, sud-ouest de la Chine	Duan <i>et al.</i> , 2014
<i>Nocardiopsis yanglingensis</i> A18	25–55	6.5–8.5	Compost de champignons	Yan <i>et al.</i> , 2011
<i>Amycolatopsis ruanii</i> NMG112T <i>A. thermalba</i> SF45T <i>A. granulosa</i> GY307T	20–50	4–10	Échantillon de sol	Zucchi <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM3095	ND	ND	ND	Yamaki <i>et al.</i> , 1997
<i>Thermomonospora curvata</i> B9T	40–65	7.5–11	Fumier composté	Chertkov <i>et al.</i> , 2011
<i>Thermobifida fusca</i> (anciennement appelé <i>Thermomonospora fusca</i> )	35–53	10–11	ND	McCarthy et Cross, 1984
<i>Thermotunica guangxiensis</i>	37–65	6–9	Compost de résidus de champignons, Chine	Wu <i>et al.</i> , 2014b
<i>Thermopolyspora flexuosa</i> DSM 41386T	40–60	6–9	Sol des montagnes du Pamir	Krasilnikov et Agre, 1964

<i>Thermocatellispora tengchongensis</i>	28–58	6–8	Échantillon de sol, sud-ouest de la Chine	Zhou <i>et al.</i> , 2012
<i>Saccharopolyspora thermophila</i> 216T	45–55	ND	Échantillon de sol, Chine	Lu <i>et al.</i> , 2001
<i>Thermobispora bispora</i> R51T	50–65	ND	Fumier en décomposition, Berlin	Henssen, 1957
<i>Thermoleophilum album</i> ATCC 35263	45–70	6.5–7.5	Échantillons de boue	Zarilla et Perry, 1984
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	37–70	4–6	Sources chaudes acides, parc national de Yellowstone	Barabote <i>et al.</i> , 2009
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> TH3	45–50	2	Site géothermique islandais	Clark et Norris, 1996
<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> IC-180T	35–58	2.0–4.5	Champ Solfatarique, Japon	Itoh <i>et al.</i> , 2011
<i>Acidithiobaculum</i> sp.	50	3	Environnements géothermiques	Norris <i>et al.</i> , 2011
<i>Ferrithrix thermotolerans</i> Y005T	43	1.3	Site minier, Royaume-Uni	Johnson <i>et al.</i> , 2009
<i>Rubrobacter taiwanensis</i> LS-28	30–70	6–11	Sources chaudes de Lu-shan, Taïwan	Chen <i>et al.</i> , 2004
<i>Rubrobacter radiotolerans</i> <i>R. xylanophilus</i>	46–48 60	7.0–7.4 7.5–8.0	Sources chaudes, centre du Portugal	Ferreira <i>et al.</i> , 1999

\*(ND) : Non déterminé

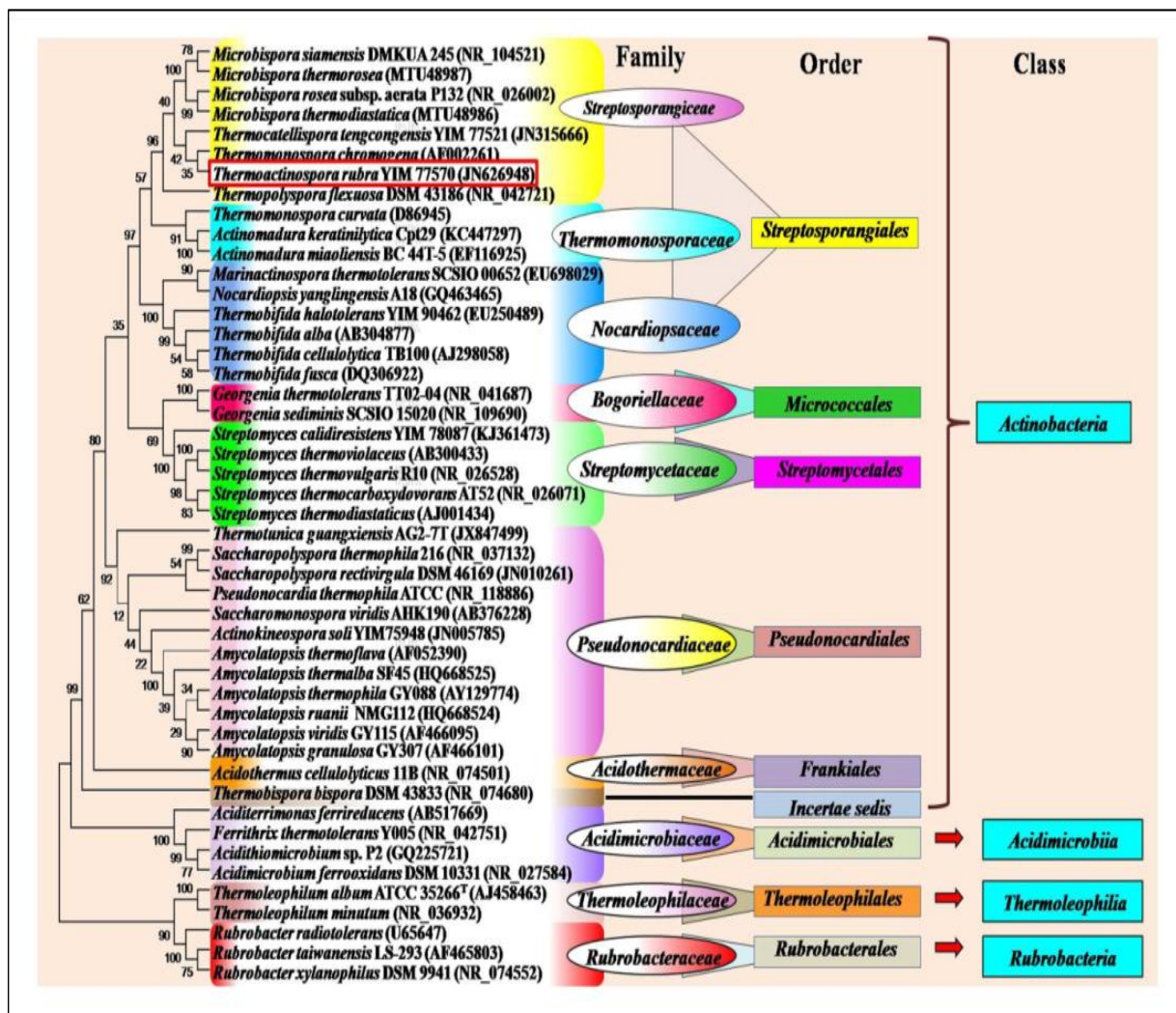
### 2-3 Physiologie

Les actinobactéries thermophiles sont strictement aérobies et chimioorganotrophes obligatoires dans la nature et se développent généralement sur la matière organique en décomposition (matières animales et végétales mortes). Il existe certaines actinobactéries thermophiles telles que *Streptomyces thermoautotrophicus* (Gadkari *et al.*, 1990) et *Acidithiobaculum* sp. qui sont des chimioautotrophes obligatoires, poussant uniquement sur le CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> et le soufre, respectivement (Norris *et al.*, 2011). D'autres modes nutritifs tels que la chimioautotrophie facultative a été illucidé chez (*Streptomyces* souche G26) (Bell *et al.*, 1988) et la méthylothrophie facultative chez (*Amycolatopsis methanolica*) (Boer *et al.*, 1990). La physiologie métabolique diversifiée des actinobactéries thermophiles, facilite la colonisation des zones topographiques hétérogènes. La prévalence des actinobactéries thermophiles a été documentée dans des sites allant de la zone steppique désertique de la Mongolie (Kurapova *et al.*, 2012) à la zone subtropicale de l'Argentine (Carrillo *et al.*, 2009) et même dans les événements hydrothermaux aux systèmes de chauffage résidentiels (Fink *et al.*, 1971). Les actinobactéries trouvés dans ces environnements sont principalement à croissance

rapide et sporulante. Les spores produites sont de type thermodurique et sont stables à des températures plus élevées pendant une durée de plusieurs jours.

### 2-4 Systématique, taxonomie et phylogénie

Les espèces thermophiles et thermotolérantes existent dans les divers genres et phylum des *Actinobacteria* (**Tableau 3**). Parmi eux, les genres *Thermopolyspora*, *Thermomonospora*, *Thermotunica*, *Thermocatellispora*, *Thermobispora*, *Acidothermus*, *Acidimicrobium* et *Thermoleophilum* qui incluent uniquement des espèces thermophiles. D'autres genres incluent à la fois des espèces thermophiles et mésophiles. Tous ces genres appartiennent à quatre classes telles que (*Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Rubrobacteria* et *Thermoleophilia* du phylum *Actinobacteria*) (**Figure 10**) (Shivlata et Satyanarayana, 2015).



**Figure 10.** Phylogramme indiquant l'emplacement et la parenté de certaines souches d'actinobactéries thermophiles et thermotolérantes appartenant à quatre classes (*Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Rubrobacteria* et *Thermoleophilia*) du phylum *Actinobacteria* (Shivlata et Satyanarayana, 2015).

## 2-5 Adaptation

Les actinobactéries thermotolérantes et thermophiles ont acquis diverses stratégies d'homéostasie telles qu'une teneur en GC comparativement aux autres actinobactéries, plus élevée dans leurs génomes, la substitution d'acides aminés dans les protéines et contiennent des composants spécifiques dans la paroi cellulaire. La plupart des thermophiles sont connus pour incorporer une quantité plus élevée d'acides aminés saturés (Asp, Glu, Arg et Lys) que les acides aminés polaires (Asn, Gln, Ser et Thr) dans leurs protéines (Suhre et Claverie, 2003 ; Shivilata et Satyanarayana, 2015). Les lipides membranaires des thermophiles contiennent plus d'acides gras saturés à chaîne droite que les mésophiles. Cela permet aux thermophiles de croître à des températures plus élevées en fournissant le bon degré de fluidité nécessaire au fonctionnement de la membrane. Également, des Protéines du type histone-like proteins (H-NS) qui se lient à l'ADN afin de le protéger, ont été identifiées chez les hyperthermophiles (Agarwal et Mathur, 2017).

## 2-6 Importance écologique

Les actinobactéries thermophiles et thermotolérantes sont reconnues détenir des taux métaboliques importants et uniques. Des propriétés physiques qui se révèlent bénéfiques dans les systèmes écologiques.

### 2-6-1 Compostage

Le compostage est un processus auto-échauffant, aérobie et de biodégradation qui fournit de l'humus et des nutriments au sol (Rawat et Johri, 2013). Le compostage implique l'action synergique des bactéries, des actinobactéries et des champignons, les actinobactéries proliférant dans les dernières étapes du compostage. La prédominance des actinobactéries thermotolérantes est généralement observée en condition thermobiotique générée par les bactéries précédentes. Au stade initial de l'état thermobiotique, le compost est colonisé par des actinobactéries thermotolérantes (*Streptomyces albus* et *Streptomyces griseus*) puis par les actinobactéries thermophiles (Goodfellow et Simpson, 1987). Des genres d'actinobactéries tels que *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Microbispora*, *Cellulosimicrobium*, *Micrococcus*, *Saccharopolyspora*, *Micromonospora*, *Thermobispora*, *Thermomonospora*, *Thermobifida* et *Planomonospora* ont été signalés comme étant impliqués dans le processus de compostage. La composition des communautés actinobactériennes varie au cours des différentes étapes du compostage (Xiao *et al.*, 2011). Ils suppriment également la croissance des agents pathogènes



des plantes en sécrétant des antibiotiques ainsi que la décomposition de la matière organique, ce qui offre un avantage supplémentaire de l'utilisation du compost afin d'améliorer les nutriments du sol et de supprimer le développement de maladies des plantes. De plus, l'ajout de compost aux sols contaminés améliore les taux de bioremédiation des systèmes telluriques par des polluants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, le pétrole, les pesticides et les métaux lourds (Chen *et al.*, 2015).

### 2-6-2 Activité anti-microbienne

Les actinobactéries thermotolérantes telles que *Streptomyces tauricus*, *S. toxytricini*, *S. coeruleorubidis*, *S. lanatus* et *Streptosporangium sp.* ont été découverts dans la rhizosphère de nombreuses plantes du désert du Koweït pendant la saison chaude (Diab et Al-Gounaim, 1985). La rhizosphère des actinobactéries présente une activité antimicrobienne, protégeant ainsi la plante de l'attaque des phytopathogènes (Xue *et al.*, 2013). Certaines actinobactéries thermotolérantes isolées des montagnes de l'Himalaya présentent également une activité antagoniste contre les bactéries et les champignons pathogènes. Ils comprennent principalement des espèces de *Streptomyces* telles que *S. phaeoviridis* et *S. griseoloalbus*, *S. viridogens* et *S. viridogens*. *S. phaeoviridis* et *S. griseoloalbus*. Ces bactéries présentent une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, y compris les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline et à la vancomycine. Les deux autres espèces de *Streptomyces* (*S. viridogens* et *S. rimosus*) sont capables de supprimer la croissance de champignons pathogènes (*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotricum falcatum* et *Helminthosporium oryzae*). Par conséquent, ces espèces de *Streptomyces* pourraient être utilisées comme bio- pesticides pour la production agricole (Radhakrishnan *et al.*, 2007).

### 2-6-3 Promotion de la croissance des plantes

Les actinobactéries sécrètent de nombreux métabolites secondaires volatils qui jouent un rôle significatif dans la résignation des maladies des plantes et dans la réduction des stress biotiques ou abiotiques. De plus, de nombreuses espèces d'actinobactéries sont connues pour sécréter les molécules organiques chélatrices du fer telles que les sidérophores qui enferment la forme solubilisée du fer ( $Fe^{+3}$ ) et l'immobilisent dans la rhizosphère des plantes qui poussent dans les sols carencés en fer. Les sidérophores modulent la croissance des plantes, directement ou indirectement, en enrichissant les autres microbes bénéfiques des plantes dans la zone de la rhizosphère (Palaniyandi *et al.*, 2013). Dimise *et al.* (2008) ont montré qu'une

actinobactérie cellulolytique vivant dans le sol, *Thermobifida fusca*, participe à la promotion de la croissance des plantes en synthétisant les sidérophores (fuscachelines) par des voies de biosynthèse des peptides.

#### 2-6-4 Fixation de l'azote

Il a été démontré que le *Frankia* et certaines actinobactéries non-Frankia fixent l'azote atmosphérique (Gtari *et al.*, 2012). Une actinobactérie thermophile, *Streptomyces thermoautotrophicus*, qui est un carboxydotrope autotrophe, a une caractéristique unique de fixation de l'azote atmosphérique (Ribbe *et al.*, 1997). Dans cette actinobactérie, le processus de fixation de l'azote est couplé à l'oxydation du monoxyde de carbone. Les électrons générés pendant le processus d'oxydation du CO réduisent l'oxygène moléculaire en radicaux libres d'oxygène. La superoxyde oxydoréductase contenant du manganèse oxyde les radicaux libres formés en O<sub>2</sub> et libère des électrons. Les électrons libérés sont en outre utilisés par l'enzyme nitrogénase afin de réduire le N<sub>2</sub> en ammoniac. La caractéristique notable de la nitrogénase de *S. thermoautotrophicus* est son insensibilité aux radicaux O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>-</sup>. En outre, il diffère également des autres nitrogénases connues en termes de structure protéique et d'exigence en Mg<sup>2+</sup> et ATP. Valdes *et al.* (2005) ont signalé que certaines espèces de *Thermomonospora* sont également capables de fixer l'azote atmosphérique.

#### 2-7 Applications

Les actinobactéries thermophiles et alcalophiles sont utiles en bioremédiation, en synthèse de nanoparticules d'or, en biofertilisants et en biopesticides (**Figure 11**). En outre, ils produisent de nouveaux composés bioactifs et des enzymes avec des applications commerciales.



**Figure 11.** Applications industrielles potentielles des actinobactéries thermophiles et alcalophiles industrielles.

### 2-7-1 Synthèse de nanoparticules d'or

Les procaryotes (bactéries et actinobactéries) ainsi que les eucaryotes (algues, champignons et levures) sont actuellement explorés pour la fabrication de nanoparticules d'or. Le mécanisme de la synthèse des particules d'or implique la réduction de  $Au^{3+}$  par les microbes lorsqu'ils sont incubés avec du chlorure d'or (Beveridge et Murray, 1980). Ils synthétisent des nanoparticules intracellulaires ou extracellulaires. Parmi eux, l'utilisation de procaryotes est préférée en raison de leur capacité à tolérer une forte concentration de métal (Silver, 2003), conduisant à la production d'un rendement plus élevé en nanoparticules. La synthèse de nanoparticules par des actinobactéries présente un avantage très important qui consiste à une propriété de polydispersité qui empêche l'auto-agrégation des nanoparticules (Ahmad *et al.*, 2003a). La synthèse de nanoparticules d'or par *Thermomonospora sp.* a été mise en évidence dans les travaux de (Ahmad *et al.*, 2003a). L'actinobactérie alcalophile *Rhodococcus sp.* a été également impliquée dans la biosynthèse des nanoparticules d'or (Ahmad *et al.*, 2003b). Les particules d'or sont utilisés dans plusieurs domaines notamment, dans les diagnostics, en thérapeutiques et en catalytiques.

### 2-7-2 Bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures

Les actinobactéries thermophiles décomposent un grand nombre de biomolécules (lignine, cellulose et hémicellulose) et recyclent les nutriments dans le sol, ce qui améliore la productivité du sol. Le processus de biodégradation de ces substrats complexes interactifs, nécessite des bactéries telles que des actinobactéries connus pour leurs aptitudes à sécréter une gamme d'enzymes hydrolytiques et oxydantes extracellulaires variées. En outre, la grande capacité de colonisation des différents écosystèmes en utilisant leurs hyphes en font que ces bactéries sont de bons candidats dans le processus de bioremédiation. Ces bactéries sont également capables de métaboliser les polymères récalcitrants (hydrocarbures, xénobiotiques et pesticides toxiques), les plastiques et le caoutchouc.

Tseng *et al.* (2007) ont isolé plusieurs espèces d'actinobactéries dégradant le plastique appartenant aux genres (*Actinomadura*, *Microbispora*, *Streptomyces* et *Saccharomonospora*). Ces actinobactéries dégradent divers polyesters biodégradables tels que le poly (succinate d'éthylène) (PES), la poly (ε-caprolactone) (PCL), le poly (hydroxybutyrate D-3) (PHB), le poly (succinate de tétraméthylène) PTMH, le poly (L-lactide) (PLA) et l'acide téréphtalique, et réduisent leurs impacts environnementaux. Il a été rapporté que d'autres actinobactéries thermophiles agissent sur le polymère (caoutchouc) et produisent des produits chimiques précieux tels que des atomes de carbone carbonyle (aldéhydes et cétone) et des espèces isoprénoïdes bifonctionnelles. Les composés organiques toxiques comprennent le phénol et les nitriles tels que l'acrylonitrile et l'adiponitrile qui sont dangereux pour la santé humaine. Ces produits chimiques nocifs doivent être dégradés. Certaines actinobactéries thermophiles, sont capables de métaboliser ces produits chimiques létaux en une forme non toxique en produisant diverses enzymes telles que le phénol hydroxylase, le polyphénol oxydase, le catéchol 2,3 dioxygénase, la laccase, la peroxydase et les enzymes de conversion du nitrile (amidases, nitrilases et nitrile hydratases).

Le pentachlorophénol est un composé organochloré qui fonctionne comme un biocide à large spectre et est principalement utilisé dans les scieries pour préserver les bois. Les sols et les ressources en eau d'une zone entourant les scieries sont contaminées par les chlorophénols, ce qui a des effets dangereux sur les systèmes biologiques. *Saccharomonospora viridis* isolé du compost de champignons est capable d'hydrolyser ce composé phénolique sous une forme non toxique (Webb *et al.*, 2001).

### 2-7-3 Biolixiviation

La biolixiviation est un processus d'extraction des métaux des minerais. La présence d'alcalophiles est comparativement moindre que celle d'acidophiles dans les sites de lixiviation des métaux. Les deux actinobactéries alcalophiles telles que *Nocardiopeis sp.* (Kroppenstedt, 1992) et la souche KBS6T de *Nocardiopeis metallicus* (Schippres *et al.*, 2002) ont l'aptitude à lixivier les métaux de la décharge de scories alcalines et pourraient être appliquées dans le processus d'extraction de métaux dans les sites alcalins.

### 2-7-4 Bioremédiation des sites contaminés par des radionucléides

Les centrales nucléaires génèrent d'énormes quantités de déchets radioactifs (radionucléides) qui contaminent les terres et les ressources en eau, par exemple les lacs et les rivières. Les sites contaminés par des radionucléides contiennent également d'autres composés toxiques tels que des métaux lourds (par exemple, le mercure) et des hydrocarbures toxiques. L'exposition à ces composés mortels sont cancérigènes, provoquent des malformations congénitales et d'autres anomalies.

Classiquement, les méthodes chimiques (extraction au solvant et oxydation chimique) ou remédiation physique (lavage des sols et extraction des vapeurs du sol) sont utilisées pour extraire ces polluants dangereux. Cependant, ces méthodes sont bien moins efficaces et sont très coûteuses. L'assainissement microbien dans ce domaine, s'est avéré être rentable avec une efficacité élevée et empêche la propagation des déchets radioactifs sur une zone plus large. Cependant, les radionucléides sont très instables et se désintègrent spontanément pour émettre de l'énergie sous forme de radiations nocives, qui agissent comme un facteur principal pour limiter l'utilisation de la biorestauration. Étant donné que la plupart de la population microbienne est sensible aux radiations et à d'autres stress, ce qui nécessite de rechercher et d'utiliser des microbes résistants aux radiations pour éliminer ou oxyder les métaux toxiques (Gholami *et al.*, 2015). Pour cela, plusieurs recherches plus ou moins récentes, ce sont orientées vers les actinobactéries afin de sélectionner des souches capables par leurs patrimoines génétiques, de résister à ces produits toxiques. Certaines espèces actinobactériennes alcalophiles (*Kocuria rosea* MG2) et tolérantes aux alcalis (*Kineococcus radiotolerans*) (Phillips *et al.*, 2002), *Rubrobacter taiwanensis* (Chen *et al.*, 2004), *Microbacterium radiodurans* (Zhang *et al.*, 2010) et *Cellulosimicrobium cellulans* UVP1 (Gabani *et al.*, 2012) sont résistants aux radiations létales et peuvent se maintenir dans des conditions difficiles, et pourraient donc être des candidats potentiels à cette fin.

### 2-7-5 Agent de contrôle biologique

Les actinobactéries sont connues pour améliorer la qualité du compost et augmenter sa teneur en éléments nutritifs. De plus, ils réduisent également l'odeur du compost car ils sont capables de digérer complètement la matière organique présente dans ce résidu (Ohta et Ikeda, 1978). Il a été démontré que les actinobactéries thermophiles (*Streptomyces sp.* N° 101 et *Micromonospora sp.* N° 604) dégradent complètement les débris de levure et désodorisent le compost (Tanaka *et al.*, 1995). Mansour et Mohamedin (2001), ont rapporté que le *Streptomyces thermodiasticus* produisait de nombreuses enzymes extracellulaires impliquées dans la lyse cellulaire de champignons pathogènes comme *Candida albicans*. Certaines actinobactéries thermophiles sont capables de supprimer les maladies des plantes, favorisant ainsi la bonne santé des plantes cultivées, ce qui entraîne une augmentation du rendement des cultures (Iijima et Ryusuke, 1996), par conséquent, ces actinobactéries thermotolérantes pourraient être utilisées comme alternative aux pesticides commerciaux.

### 2-7-6 Production de composés bioactifs

Les actinobactéries sont une riche source de composés cliniquement importants, surtout les composés ayant des activités antitumorales, antimicrobiennes et immunosuppressives (Pritchard, 2005). Ils sont les plus grands producteurs d'antibiotiques parmi tous les microbes et produisent environ 55% du total des antibiotiques connus (Raja et Prabakarana, 2011). Parmi ceux-ci, 75% ont été découverts à partir de *Streptomyces* et les 25% restants provenaient d'espèces non-*Streptomyces*. Les composés bioactifs découverts jusqu'à ce jour sont en grande partie d'origine mésophile. Un très petit nombre de composés naturels ont été signalés chez les actinobactéries thermophiles (**Tableau 4**).

La plupart des antibiotiques d'origine mésophile sont thermolabiles, c'est-à-dire qu'ils nécessitent une basse température pour maintenir leur efficacité, ce qui peut être problématique pour des pratiques de stockage et d'expédition plus longues. L'utilisation systématique de ces antibiotiques entraîne leur dégradation en raison de congélations et décongélations répétées (Eisenhart et Disso, 2012). Certains antibiotiques sont insolubles dans l'eau (Stone, 1960) et labiles aux solvants organiques, ils doivent donc être dissous dans de l'eau chaude pour améliorer leur solubilisation. L'exploration d'autres actinobactéries notamment les thermophiles, est sûrement une alternative sérieuse afin de produire des antibiotiques thermostables et très stables.

**Tableau 4:** Composés bioactifs produits par les actinobactéries thermophiles.

Isolats	Composés bioactifs	Activité	Références
<i>Excellospora viridilutea</i> SF2315 [reclassé comme <i>Actinomadura viridilutea</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2001)]	SF2315A et B	Antibactérienne	Sasaki <i>et al.</i> , 1988
<i>Streptomyces thermophilus</i>	Thermomycine	Antibactérienne	Schone, 1951
<i>Thermomonospora sp.</i>	T-SA-125	Antibactérienne	Dewendar <i>et al.</i> , 1979
<i>Streptomyces refuineus</i> subsp. <i>Thermotolerans</i>	Anthramycine	Antitumorale Antimicrobien	Hu <i>et al.</i> , 2007
<i>Microbispora aerata</i>	Diketopiperazine	Agents neuroprotecteurs	Ivanova <i>et al.</i> , 2013
<i>Microbispora aerata</i>	Microbiaeratine	Médicament antiprolifératif et cytotoxique	Ivanova <i>et al.</i> , 2007
<i>Marinactinospora thermotolerans</i>	$\beta$ -Carboline et indolactam alkaloids	Antipaludéen	Huang <i>et al.</i> , 2011

### 2-7-7 Synthèse d'autres composés pharmaceutiques

Les actinobactéries synthétisent un large éventail de composés pharmaceutiques autres que les antibiotiques. Il s'agit principalement d'antioxydants, de composés anti-inflammatoires et d'enzymes cliniquement importantes (**Tableau 5**). Les antioxydants produits par les actinobactéries thermophiles et alcalophiles sont la mélanine, l'acide férulique et la canthaxanthine. Ces antioxydants ont de multiples utilisations dans le domaine médical, qui ont été utilisés dans le traitement du cancer, des maladies cardiaques et récemment dans des troubles neurodégénératifs tels que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Shivlata et Satyanarayana, 2015).

Certaines enzymes cliniquement importantes ont également été signalées à partir d'actinobactéries thermophiles telles que *Streptomyces sp.* (Chitte et Dey, 2002; Chitte *et al.*, 2011) qui produisent des enzymes fibrinolytiques. Les enzymes fibrinolytiques dissolvent le caillot sanguin (fibrine) en peptides plus petits et diminuent la viscosité du sang, et peuvent être utilisées pour réduire le risque d'artériosclérose, de crise cardiaque et d'accident vasculaire cérébral. L'asparaginase est une enzyme anticancéreuse bien connue qui inhibe la croissance de cellules à division rapide incontrôlées en hydrolysant l'acide aminé asparagine qui est requis par les cellules cancéreuses à prolifération rapide. Hatanaka *et al.* (2011a) ont cloné et exprimé l'asparaginase de *Streptomyces thermoluteus subsp. fuscus* NBRC 14270.

Une autre enzyme de valeur pharmaceutique, la X-prolyldipeptidyl aminopeptidase (XDAP) est connue pour être produite par des *Streptomyces thermophiles sp.* (Hatanaka *et al.*, 2011b), qui agit sur les protéines riches en proline et produit des peptides courts. Ces peptides agissent comme des inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV) et peuvent réguler les taux de sucre dans le sang, car la DPP-IV dégrade la protéine 1 de type glucagon (GLP-1) qui régule la production d'insuline et abaisse le taux de sucre dans le sang. Ainsi, il pourrait être utilisé avec le GLP-1 pour traiter le diabète (Hatanaka *et al.*, 2011b).

Une autre enzyme cliniquement importante, la vitamine D3 hydroxylase convertit le cholécalférol (VD3) en sa forme biologiquement active calcitriol [ $1\alpha, 25$  (OH)  $2VD3$ ]. Le cholécalférol (VD3) est une forme inactive, synthétisée à partir du 7-déhydrocholestérol dans la couche épidermique de la peau par réaction électrocyclique sur l'irradiance des ultraviolets. La bioconversion du VD3 est un processus en deux étapes, d'abord il est converti en calcidiol [ $25$  (OH) VD3] par P450 dans le foie, puis ensuite hydrogéné en calcitriol par P450 dans le rein. Le calcitriol est une forme physiologiquement active de vitamine D, impliquée dans la régulation de la concentration de calcium et de phosphate dans le plasma sanguin. Ce calcidiol et calcitriol peuvent être synthétisés artificiellement à partir du cholestérol par un processus chimique en plusieurs étapes, mais le rendement est très faible. Il existe donc un besoin d'une enzyme capable de catalyser l'hydrogénation de VD3 en une seule étape. Fujii *et al.* (2009) ont montré que *Pseudonocardia autotrophica* produit de la vitamine D3 hydroxylase catalysant la conversion de VD3 en calcitriol et pourrait donc être utilisée dans la production de vitamine D (Fujii *et al.*, 2009).

Deux espèces d'actinobactéries thermophiles, *Thermomonospora alba* (Suzuki *et al.*, 2001) et *Thermobifida alba* (Suzuki *et al.*, 1998), produisent des composés tels que respectivement, la topostatine et l'isoaurostatine. Ces deux composés agissent comme des inhibiteurs de l'ADN topoisomérase et interfèrent avec les processus cellulaires tels que la réplication, la transcription et la traduction des virus, et pourraient donc fonctionner comme des composés Agents antidiabétiques antiviraux potentiels. D'autres composés produits par les actinobactéries thermophiles et alcalophiles sont regroupés dans le **Tableau 4**.



**Tableau 5 :** Composés et enzymes à valeur pharmaceutique produits par des actinobactéries thermophiles et alcalophiles.

Composés biologiques	Isolats actinobactériens	Usages	Références
<b>Antioxydants et composés anti-inflammatoires</b>			
Mélanine	<i>Streptomyces lusitanus DMZ-3</i> <i>Streptomyces sp.</i> <i>Streptomyces species D5</i>	Composé cytotoxique Antioxydant Traitement des troubles neurogènes	Madhusudhan <i>et al.</i> , 2014 Quadri and Agsar, 2012 Diraviyam <i>et al.</i> , 2011
Acide férulique	<i>Thermobifida fusca PU13-13</i>	Antioxydant Anti-inflammatoire	Huang <i>et al.</i> , 2013
Canthaxanthine	<i>Dietzia sp. K44</i>	Antioxydant Additif alimentaire Produits de beauté	Venugopalan <i>et al.</i> , 2013
Caroténoïdes	<i>Dietzia natronolimnaea HS-1</i>	Antioxydant Additif alimentaire Produits de beauté	Gharibzahedi <i>et al.</i> , 2014
<b>Enzymes pharmaceutiques précieuses</b>			
Vitamin D3 hydroxylase	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	Métabolisme osseux Immunité Régulateurs de croissance cellulaire	Fujii <i>et al.</i> , 2009
Enzyme fibrinolytique	<i>Streptomyces sp. MCMB-379</i> <i>Streptomyces megasporus SD5</i>	Dissolution du caillot sanguin	Chitte <i>et al.</i> , 2011 Chitte and Dey, 2002
Asparaginase recombinante	<i>Streptomyces thermoluteus</i> subsp. <i>fuscus</i> NBRC 14270	Traitement de la leucémie	Hatanaka <i>et al.</i> , 2011a
L-Glutaminase	Alkaliphilic <i>Streptomyces sp. SBU1</i>	Traitement de la leucémie	Krishnakumar <i>et al.</i> , 2011
Ribonuclease	Alkaliphilic <i>Streptomyces sp. M49-1</i>	Antivirale	Demir <i>et al.</i> , 2013
Kératinase, enzyme dégradant la PrPSc	<i>Nocardiopsis</i> strain TOA-1	Médicament antiprion	Mitsuiki <i>et al.</i> , 2010
X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidases recombinantes (XDAP)	<i>Streptomyces thermoluteus</i> subsp. <i>fuscus</i> NBRC 14270 <i>S. thermocyaneoviolaceus</i> NBRC 14271	Agents antidiabétiques	Hatanaka <i>et al.</i> , 2011b
<b>Inhibiteur de l'aldose reductase</b>			
YUA001	<i>Corynebacterium sp. YUA25</i>	Agents antidiabétiques	Bahn <i>et al.</i> , 1998
<b>Inhibiteurs de la polymérase d'ADN</b>			
Topostatine	<i>Thermomonospora alba</i> Souche n ° 1520 III [reclassée]	Antivirale	Suzuki <i>et al.</i> , 1998

	<i>Thermobifida alba</i> (Zhang <i>et al.</i> , 1998)]		
Isoaurostatine	<i>Thermomonospora alba</i> [reclassée <i>Thermobifida alba</i> (Zhang <i>et al.</i> , 1998)]	Antivirale	Suzuki <i>et al.</i> , 2001

### 2-7-8 Enzymes importantes sur le plan industriel

Les actinobactéries thermophiles et alcalophiles produisent également un certain nombre d'enzymes comme les amylases, les protéases, les lipases, les cellulases, les xylanases, les inulinases, les dextranases et les kératinases (**Tableau 5**). Ces molécules thermostables ont été produites et actuellement commercialisés dans le monde entier (**Figure 12**). Certaines enzymes actinobactériennes importantes sont brièvement décrites ci-dessous.



**Figure 12.** Application d'enzymes importantes produites par des actinobactéries thermophiles et alcalophiles.

#### 2-7-8-1 Amylase

Le procédé d'hydrolyse de l'amidon donne des oligosaccharides et d'autres sucres simples qui sont utilisés dans le secteur de l'alimentation et dans l'industrie des sirops. Le traitement industriel de l'amidon implique deux étapes nécessitant une forte énergie:

- (1) Liquéfaction (ou gélatinisation de molécules d'amidon) qui fonctionne à très haute température (105-110 °C) pendant 5 min.

(2) Saccharification (conversion de l'amidon en sucres plus simples) qui nécessite une température de 55 à 60 °C (Vieille et Zeikus, 2001).

Les amylases thermostables qui se lient à l'amidon brut sont devenues de plus en plus attractives pour abaisser le coût du procédé puisqu'elles ne nécessitent pas de substrat gélatinisé pour leurs hydrolyses. Les deux actinobactéries thermophiles *Streptomyces sp.* (Kaneko *et al.*, 2005) et *Streptomyces sp.* N°4 (Primarini et Ohta, 2000), produisent des amylases de liaison d'amidon brut qui pourraient être appliquées pour réduire l'apport énergétique, rendant le processus industriel global plus rentable. D'autres actinobactéries thermophiles sont connues pour produire des amylases thermostables à forte teneur en maltotriose qui pourraient être applicables dans les industries alimentaires (**Tableau 6**).

### **2-7-8-2 Protéases**

Les protéases sont l'une des classes les plus importantes d'enzymes hydrolytiques, qui constituent plus de 65% des applications industrielles totales. Un large éventail d'espèces actinobactériennes (comprenant à la fois des alcalotolérants et des alcalophiles) produisent des protéases alcalinisables et de la kératinase d'intérêt commercial. Les protéases alcalinisables possèdent des applications considérables dans diverses industries telles que les industries des détergents, du cuir et dans l'alimentation (Ellaiah *et al.*, 2002). Les protéases alcalistables sont également utilisées dans le processus de récupération de l'argent à partir de films radiographiques ou photographiques usagés. Les protéases produits à partir des actinobactéries alcalophiles sont non seulement alcalinisables mais également thermostables (Gohel et Singh, 2012a). Les protéases thermostables alcalines peuvent être utilisées dans les industries qui nécessitent des conditions alcalines et de température élevée, comme l'industrie du cuir.

### **2-7-8-3 Cellulases, xylanase et acétyl xylane estérase**

Les cellulases et les xylanases sont également des enzymes importantes sur le plan industriel. Ils sont très utilisés dans les industries des résidus agricoles, pour la production de biocarburant. Les conditions de cette technologie, exigent des enzymes hautement thermostables. Dans ce contexte, deux actinobactéries thermophiles, *Acidothermus cellulolyticus* (Mohagheghi *et al.*, 1986) et *Thermobifida fusca* (Kim *et al.*, 2005) ont révolutionner de manière très importante l'industrie des biocarburants ainsi que plusieurs autres industrie alimentaire, textile, papier etc.... Ce sont des bactéries capables de

dégrader par leurs systèmes enzymatiques, les fractions de cellulose et de xylane des résidus lignocellulose. Les cellulases de *T. fusca* et *A. cellulolyticus* ont été largement étudiées et sont utilisées dans la production de bioéthanol à partir de composants de cellules végétales. Une cellulase de *T. fusca* présente un avantage supplémentaire dans l'extraction des composés phénoliques de la peau de pomme, qui peuvent être utilisés comme antioxydants (Kim *et al.*, 2005). Cet actinobactérie modérément thermophile, sécrète également de l'acétyl xylane estérase thermostable. Cette enzyme est capable de catalyser l'élimination du groupe acétyle de l'acétylxylane, cela facilite l'accès des xylanases au substrat conduisant à sa dégradation complète (Yang et Liu, 2008). Des enzymes thermostables et alcalistables capables de dégrader le substrat lignocellulose ont également été caractérisés à partir d'autres actinobactéries thermophiles et alcalophiles (**Tableau 6**).

#### **2-7-8-4 Dextranase**

Le processus de production de sucre à partir du jus de canne à sucre nécessite une température élevée et un pH alcalin. Les micro-organismes indigènes présents dans le jus peuvent produire du dextrane qui doit être dégradé, sans quoi le filtre se bloque et le processus de la clarification ralentit diminuant ainsi le rendement et la qualité du sucre produit (Purushe *et al.*, 2012). Le processus de cette technologie, se produit à haute température et à pH alcalin, l'ajout de dextranase alcalithermostable avant le traitement, peut également améliorer le rendement ainsi que la qualité du sucre produit. Les dextranases produites par certaines actinobactéries thermoalcalophiles telles que *Streptomyces sp.* NK458 est bien adapté pour une telle application (Purushe *et al.*, 2012).

#### **2-7-8-5 Nitrile Hydratase**

Une autre enzyme connue sous le nom de nitrile hydratase a été rapportée à partir d'un grand nombre d'actinobactéries mésophiles et thermophiles. Elle est impliquée dans la biotransformation des nitriles en composés utiles tels que les amines, les amides, les amidines, les acides carboxyliques, les esters, les aldéhydes et les cétones (Banerjee *et al.*, 2002). L'applicabilité industrielle des nitriles hydratases thermostables exige une étude détaillée sur les enzymes des actinobactéries thermophiles. La nitrile hydratase thermostable de *Pseudonocardia thermophila* a récemment été immobilisée dans la matrice de gel pour la production d'acrylamide (Martinez *et al.*, 2014).

### 2-7-8-6 Laccase

La laccase catalyse l'oxydation des composés phénoliques (2,6 diméthylphénylalanine et p-aminophénol) et produit des couleurs, par conséquent, elle est utilisée comme colorant capillaire. La coloration se produit mieux à un pH alcalin, car dans un état alcalin, les cheveux ont tendance à gonfler, ce qui facilite la pénétration des molécules de colorant. Par conséquent, une laccase alcalinisable serait le meilleur candidat à utiliser pour une telle application. Les actinobactéries sont connues pour produire de la laccase thermoalcalistable (C'est le cas par exemple de *Thermobifida fusca* BCRC 19214) (Chen *et al.*, 2013).

### 2-7-8-7 Alginate Lyase

L'alginate est un polysaccharide acide linéaire, produit comme un composant majeur de la paroi cellulaire des algues. Il se compose d' $\alpha$ -D-mannuronate (M) lié en 1,4 et de son épimère  $\alpha$ -L-gulonate (G). Ces monomères polymérisent de trois manières: homopolymérisation de blocs G [poly (G)], homopolymérisation de blocs M [poly (M)] et finalement, hétéropolymérisation de blocs MG [poly (MG)] (Gacesa, 1992). Les alginate lyases agissent sur ces polymères pour produire des oligosaccharides d'alginate qui peuvent être utilisés comme agents thérapeutiques (anticoagulant, agent antitumoral et anti-inflammatoire) (Iwamoto *et al.*, 2005). Les alginate lyases sont classés en deux types (monofonctionnel et bifonctionnel) sur la base de leur spécificité de substrat. Les enzymes monofonctionnelles peuvent agir sur poly (M) ou poly (G) et les enzymes bifonctionnelles préfèrent le poly (MG) (Tondervik *et al.*, 2010). Mais il y a moins de rapports sur l'alginate lyase bifonctionnelle et thermostable. Il a été démontré qu'une actinobactérie alcalitolerante, *Isosphaera halotolerans* CGMCC 5336, produit une alginate lyase bifonctionnelle modérément thermostable (Dou *et al.*, 2013).

### 2-7-8-8 Alditol oxydase

L'oxydation des alcools primaires et secondaires donne des produits oxydants qui sont utilisés pour synthétiser d'autres composés utiles. Les méthodes d'oxydation chimique arbitrent la réaction, en utilisant des métaux lourds tels que le chrome et le manganèse. De manière intéressante, des biocatalyseurs peuvent également être utilisés pour dériver de telles réactions d'oxydation, par exemple l'alcool déshydrogénase. Cependant, cette enzyme nécessite le NAD (P)<sup>+</sup> (comme co-facteur) pour la réaction, ce processus est très coûteux. Pour surmonter cet inconvénient, la recherche se concentre sur l'isolement et la caractérisation de la

flavoprotéine alditol oxydase thermostable (AldO) à partir de sources microbiennes pour des applications industrielles. Le gène d'AldO d'une actinobactérie thermophile (*Acidothermus cellulolyticus*) a été identifié lors de la recherche des homologues de l'AldO bien caractérisé de *Streptomyces coelicolor* dans la base de données génomiques (Winter *et al.*, 2012). Le gène d'AldO a été cloné et exprimé dans *E. coli* et l'enzyme recombinante AldO présente une thermostabilité élevée (demi-vie à 75 °C de 112 min) et nécessite de l'oxygène moléculaire moins cher comme accepteur d'électrons terminal. Par conséquent, cette enzyme est utilisée comme alternative aux catalyseurs chimiques dans ces processus industriels.

#### **2-7-8-9 Monoxyde de carbone déshydrogénase**

Le monoxyde de carbone déshydrogénase est une enzyme oxydoréductase qui catalyse l'interconversion entre le monoxyde de carbone et le dioxyde de carbone. Cette enzyme est produite dans les microbes anaérobies et aérobies pendant le mode de nutrition autotrophique. L'enzyme a une grande affinité pour se lier au CO, piégeant ainsi le CO de l'environnement. Cette enzyme a été appliquée dans des biofiltres pour purifier ces gaz toxiques libérés par les différentes industries. Il a été rapporté que *Streptomyces spG26* (Bell *et al.*, 1988) et *Streptomyces thermoautotrophicus* (Gadkari *et al.*, 1990), produisent la monoxyde de carbone déshydrogénase thermostable qui est bien adaptée pour filtrer l'air chaud émis par les industries. Cela peut également être utilisé dans le biocapteur pour détecter et quantifier la concentration atmosphérique en CO.

#### **2-7-8-10 Cutinase**

La cutinase est une sérine estérase qui agit sur les liaisons esters de la cutine (un composant de la couche cuticulaire des parties aériennes de la plante). *Thermobifida fusca* produit deux types de cutinases qui présentent une thermostabilité plus élevée que les cutinases fongiques (Chen *et al.*, 2010). L'enzyme présente une large spécificité de substrat tel que la cutine végétale, les esters solubles / insolubles en les hydrolysant en acides gras hydroxyle et hydroxy époxy en tant que produits finaux. Ces acides gras peuvent être utilisés comme substrat dans les réactions d'estérification énantiométriques ou dans la production de composés phénoliques ainsi que de l'huile et des produits laitiers. L'enzyme peut également métaboliser les polyesters synthétiques et d'autres polluants organiques (Kleeberg *et al.*, 2005), par conséquent, pourrait être utilisée dans les processus de biodégradation *in vitro*.

**Tableau 6:** Enzymes commerciales produites par des actinobactéries thermophiles et alcalophiles.

Enzymes	Souches d'actinobactéries	Température - pH optimaux	Applications industrielles	Références
Amylase	<i>Thermomonospora viridis</i> TF-35	60°C - 6.0	Détergente Levain Papier et pâte	Takahashi <i>et al.</i> , 1992
	<i>Thermomonospora curvata</i>	65°C - 5.5–6.0	Industrie textile	Glymph and Stutzenberger, 1977
Protéase	<i>Saccharomonospora viridis</i> SJ-21	70°C - 9	Détergents Pharmaceutique Cuir	Jani <i>et al.</i> , 2012
	<i>Nocardiopsis prasina</i> HA-4	55°C - 7–10	Brassage	Ningthoujam <i>et al.</i> , 2009
Kératinase	<i>Actinomadura keratinilytica</i> strain Cpt29	70°C - pH 10	Industrie du cuir Utilisations pharmaceutique s	Habbeche <i>et al.</i> , 2014
	<i>Thermomonospora curvata</i>	65°C - pH 6		Stutzenberger, 1971
Xylanase	<i>Thermomonospora fusca</i>	60°C - 7.0	Papier et pâte Levain	McCarthy <i>et al.</i> , 1985
	<i>Kocuria</i> sp. RM1	30–85°C - 4.5–9 60°C - 9.0	L'alimentation animale	Krishna <i>et al.</i> , 2008 Techapun <i>et al.</i> , 2002
	<i>Streptomyces</i> sp. Ab 106			
Acetylxylylan estérase	<i>Thermobifida fusca</i> NTU22	80°C - 8.0	Papier et pâte	Yang and Liu, 2008
Dextranase	<i>Streptomyces</i> sp. NK458	60°C - 9.0	Moulins à sucre	Purushe <i>et al.</i> , 2012
Nitrile hydratase	<i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM 3095	Thermostable 50–80°C	Production d'acrylamide	Martinez <i>et al.</i> , 2014
Laccase	<i>Thermobifida fusca</i> BCRC 19214	Stable à 50 °C - pH 10,0	Traitement des déchets Traitement des teintures textiles	Chen <i>et al.</i> , 2013
Carbon monoxide dehydrogenase	<i>Streptomyces</i> sp. strain G26	69°C	Génération de bioénergie Biofiltres	Bell <i>et al.</i> , 1988

### Chapitre 3: Les eaux thermales en Algérie

Les sources géothermiques sont considérées comme des points hydriques chauds. L'Algérie est l'un des pays les plus riches du monde en termes de sites géothermiques, avec plus de 240 sources chaudes à travers le pays (température comprise entre 22 et 98 °C) (Saibi, 2009). Le Hammam Debagh, également nommé Hammam Challala offre des eaux très chaudes avec des températures allant jusqu'à 98 °C C'est la source terrestre la plus chaude du pays (Stambouli *et al.*, 2012) et la deuxième au monde après celles de l'Islande (Boukhenfouf et Boucenna, 2019). Les sources chaudes algériennes n'étaient autrefois utilisées que comme spas pour la balnéologie (Fekraoui et Kedaïd, 2005), pour leurs effets thérapeutiques (Liang *et al.*, 2015). À ces endroits, les chercheurs se sont principalement intéressés au potentiel géothermique, à la composition physico-chimique et aux études de contamination bactériologique et fongique pour assurer la sécurité des utilisateurs (Amarouche-Yala *et al.*, 2015; Benammar *et al.*, 2017; Ait Ouali *et al.*, 2019 ). Malgré des études intensives sur les sources thermales terrestres à travers le monde, on en sait très peu sur la biodiversité microbienne des sources thermales en Algérie. Bien que récemment, des études sur les thermophiles aient émergé, elles restent cependant, limitées à quelques sources chaudes (Arab *et al.*, 2018; Gomri *et al.*, 2018).

#### 3-1 Définition

Différentes définitions ont été données pour une source thermique, selon le dictionnaire Online Miriam-Webster « *une source d'eau chaude sa température est supérieur à la température de son environnement* ». Il y a aussi une la définition d'Allan Pentecost qui a avancé « *qu'une source chaude est toute source naturelle dont la température est supérieure à celle du corps humain (normalement entre 36.5°C et 37.5°C)* » (Allan *et al.*, 2003). La définition de Schoeller, considère comme source thermique « *les eaux dont la température à l'émergence est supérieure à la température moyenne annuelle de l'air de plus de 4°C au lieu de l'émergence* ». Par conséquent, le seuil de thermalité c'est l'élément qui contrôle le thermalisme de l'eau, ce seuil est fixé en Europe à 18 – 20°C, et de 20°C aux U.S.A.

L'eau provenant d'une source chaude subie une variation de température liée à la profondeur. Ce chauffage est dû à l'énergie thermique qui provient de celle de la terre. En générale, la température des roches de la croûte terrestre augmente en fonction de la profondeur. On appelle cela le gradient géothermique. C'est le cas des régions non volcaniques où le contact de l'eau avec les roches chaudes fait que la température augmente. Pour les régions volcaniques, comme dans le parc de Yellowstone aux Etats-Unis, l'eau est



tout simplement chauffée par un contact direct avec le magma. Les sources chaudes existent sur tous les continents, ainsi qu'au fond des mers.

La minéralisation des eaux est déterminée surtout par la nature chimique et minéralogique des sédiments qu'elles traversent. Les sources thermales les plus minéralisées en Algérie, sont en relation directe avec les sédiments gypso-salins du Trias si répandu dans le pays (Guigue, 1947). Ce cas est rencontré à titre d'exemple à Hammam Melouane 29.42 gr/l, Hammam El Biban 15gr/l, Hammam Salhine 9 gr/l.

### 3-2 Classification

Les eaux des sources thermales peuvent être catégorisées en se basant sur différents critères comme :

a- L'origine géologique

b- La composition chimique : Selon ce critère, il y a trois types de classifications :

-La classification basée sur les présentations graphiques des eaux sur le diagramme de piper.

-La classification basée sur la concentration des ions qui est supérieur à 20%. Cette classification donne trois groupes : eaux sulfatées, eaux bicarbonatées et eaux chlorurées.

-La classification proposée par Vuataz (1986), basée sur l'anion ou le cation le prédominant.

c- La classification thérapeutique: eaux hypotoniques et hypertoniques.

d- La température : constitue un critère essentiel sur le quel plusieurs classifications ont été élaborées. En se basant sur ce paramètre (Scholler, 1962 ; Castany, 1967), les sources thermales peuvent être classées en :

-Eaux hypothermales: Ce sont des eaux dont la température à l'émergence est inférieure à celle de la partie supérieure de la zone d'homothermie, ou à la température moyenne inter-annuelle du lieu d'émergence plus 4°C.

-Eaux métriothermales: Ce sont des eaux dont la température à l'émergence est inférieure à 30 °C mais supérieure à celle des eaux hypothermales.

-Eaux mésothermales: Ce sont des eaux dont la température à l'émergence est entre 30 °C et 50 °C.

- Eaux hyperthermales: Ce sont des eaux dont la température à l'émergence est supérieure à 50 °C et inférieure à 100 °C.

### 3-3 Les Stations thermales en Algérie

Les stations thermales algériennes remontent à l'époque romaine. Aujourd'hui comme dans le passé, les stations thermales sont très sollicitées pour divers traitements d'ordre rhumatologique, dermatologique, respiratoire, psychiatrique et bien d'autres. Parmi les nombreuses stations thermales qui existent en Algérie, les plus connues et les plus fréquentées sont citées par région.

#### 3-3-1 Région Algéroise

- Hammam Righa: Situé à 100 Km au Sud-Ouest d'Alger dans la wilaya d'Ain el Defla à une altitude de 525 mètres. Il se trouve dans une région verdoyante et boisée appréciée pour ses qualités climatiques. Les eaux de cette source sont sulfatées calciques hyperthermales (54 °C). Selon Pouget et Chouchak, le pH de cette eau est de 6.18 avec une conductivité de 5600 µmho/cm.

- Hammam Melouane: Situé à 15 Km au Sud-Ouest d'Alger dans la wilaya de Blida (Daira de l'Arabaa). Cette source a une température de 30°C, un pH de 6.44 et une conductivité de 20000 µmho/cm mesurée à 20°C. Cette forte conductivité résulte de la forte teneur en sel. Cette source est caractérisée aussi par une radioactivité de 0.02 nanocuries/l (Pouget et Chouchak, 1967). Elle est caractérisée par une prédominance des Chlorures, du Sodium et du Strontium.

- Hammam Tellat : Situé à quelques dizaines de kilomètres au Nord-Est de la ville de Lakhdaria. La température de l'eau est de 32°C, avec un pH de 6.7, une conductivité de 2800 µmho/cm. Le débit de cette source est de 5 l/s. Ces eaux sont de nature hyper sulfatées calciques.

- Hammam Ksenna: Situé à environ 60 kilomètres d'Alger dans la commune d'Ain-Bassem. Ces eaux ont une température de 62°C (Guigue, 1952), un pH variant entre 6.43–6.53 et une conductivité de 17680 µmho/cm. Le débit est de 3.000 l/min. Une radioactivité a été aussi mesurée (0.45 millimicrocuries/l). Selon Guigue, 1952, ces eaux sont de nature hyper chlorurées sodiques et potassiques, avec une production de H<sub>2</sub>S qui provient de la réduction des sulfates par action des bactéries, et de CO<sub>2</sub> (de l'ordre de 448mg/l).

- Hammam Ibainem: Situé à quelques dizaines de Kilomètres au Sud-Est de la ville d'Akbou. Il a une température qui varie entre 50 et 58°C, un pH de 6.2, une conductivité de 20000

$\mu\text{mho/cm}$  et une radioactivité de 0.8 nanocuries. Ces eaux contiennent des teneurs élevés en chlorures, en calcium, en sulfate et en bicarbonates et un dégagement fort de  $\text{CO}_2$  (Nedjai, 1987).

- Hammam Berrouaghia: Situé à 6 km de la gare de Berouaghia. Cette source est caractérisée par une température de  $44^\circ\text{C}$ , un pH de 7, un débit de 60 l/min, une conductivité de  $2875\mu\text{mho/cm}$  et une radioactivité de 0.21 nanocuries/l (Pouget et Chouchak). Ces eaux sont de nature bicarbonatée sodique. Cette source est très efficace pour les affections cutanées (Nedjai, 1987).

- Hammam Sidi Yahiya: Située à environ 5 Km au Sud du Village d'Akbou. Ces eaux sont caractérisées par une température de  $42^\circ\text{C}$ , un pH de 6, une conductivité de  $20000\mu\text{mho/cm}$ , et une radioactivité de 0.94 nanocuries/l. Ces eaux sont hyper chlorurées sodiques.

- Hammam Sillal: Situé en grande kabyle environ 16 km au nord-Ouest de Sidi Aich, dans la commune d'Akfadou. La température de cette source varie entre  $46^\circ\text{C}$  et  $48^\circ\text{C}$ , son pH est de 6, sa conductivité est de  $6430\mu\text{mho/cm}$  et sa radioactivité est de 0.16 – 0.2 nanocuries/l. Ces eaux sont de nature Chlorurée sodique (Pouget et Chouchak 1967).

### **3-3-2 Région Est-Algérien**

- Hammam et Biban (les portes de fer): Situé à 6 kilomètres de la gare de Constantine. Il est caractérisé par une température élevée de  $90^\circ\text{C}$ , un pH qui varie entre 6 et 6.19, une conductivité de  $20000\mu\text{mho/cm}$  et une radioactivité de 0.12 nanocuries/l (Savornin, 1913). Cette source est caractérisée par une odeur sulfureuse, elle est de nature hyper chlorurée sodique et potassique (Nedjai, 1987).

- Hammam sidi M'Cid: Situé à l'entrée du ravin de Rhumel, aux porte même de Constantine. L'eau a une température de  $30^\circ\text{C}$  et un débit de 4 l/min.

- Hammam Guergour: Située à 60 Km au Nord-Ouest de Sétif à la sortie des gorges traversées par l'Oued Bousellem. Les eaux de cette source sont catégorisées hyperthermales avec une température de  $44^\circ\text{C}$ , un pH de 6.9, un débit de 2500 à 2800l/min et un taux élevé de la radioactivité (122-150 millimicrocuries/l) (Boudoukha et Athamna, 2012). Ces eaux sont classées comme des eaux sulfatées-calciques et chlorurée sodiques. Aujourd'hui, la station thermale de Hammam Guerguour accueille des curistes pour des soins rhumatologiques et neurologiques.

- Hammam sokhna: La source de Hammam Sokhna se trouvant au sud Sétifien, la température de son eau à l'émergence varie entre  $25^\circ\text{C}$  et  $43^\circ\text{C}$  (Boudoukha et Athamna, 2012), son pH est légèrement alcalin (7,25-7,65) et sa salinité est moyenne étant donné que la conductivité électrique varie entre 3200 et  $3710\mu\text{S.cm}^{-1}$ . Cette eau est saturée en anhydrite, aragonite,

calcite, calcedoine, chrysotile, dolomite, gypse, sépiolite, talc et en silice (Boudoukha *et al.*, 2015).

- Hammam Meskhoutine (Debagh): Cette station thermale appartient aux eaux hyperthermales, (la plus chaude en Algérie), dont la température est de 90 à 98 °C. Elle est située à l'Est du Constantinois, à 110 Km de Constantine et 20 Km de Guelma. Son site se trouve à 320 mètres d'altitude. Il est particulièrement surprenant au sein des collines et des montagnes boisées, à proximité de cascades solidifiées à l'aspect lunaire. Cette source est caractérisée par un pH de 7.75 et un débit constant et permanent de 1650l/s et une radioactivité de 13 millimicrocuries/l. (Boudoukha et Athemna, 2012). Cette source est de nature Saline et Calcique, elle contient du Sodium (240mg/l), du Chlore (370mg/l), du Calcium (130mg/l), de SO<sub>4</sub> (385mg/l), du Potassium (46 mg/l), du HCO<sub>3</sub> (183mg/l) et le Magnésium (37.4mg/l) avec dégagement de l'Hydrogène Sulfuré (6.80mg/l) (Lahlou *et al.*, 1998; Dib, 2004; Bouannane *et al.*, 2011). Les indications sont prioritairement rhumatologiques mais aussi respiratoires.

- Hammam Belhachani: située au Sud de Guelma à 10 km d'Aïn Makhoulouf et à 10 km d'Aïn El Arbi. Elle se trouve dans une Mechta à 2 km à droite de la route AïnMekhoulouf – AïnEl Arbi. Les eaux de cette source sont caractérisées par un faible débit (0,5 l/s) et une température élevée qui est variée de 63 à 72 °C et une nature chimique de type sulfaté calcique (Bekkouche, 2016).

- Hammam Guerfa: Situé à 37 km au Sud de Guelma, sur la route AïnMekhoulouf –Aïn El Arbi. Il est situé à 500 m de la rive gauche de l'Oued Cheniour. Cette source a une température qui varie entre 60 et 68°C. Elle est caractérisée par un débit de 1.1 l/s. et une odeur hydrogène sulfaté, sa nature chimique est sulfaté calcique (Bekkouche, 2016) avec un dégagement de gaz H<sub>2</sub>S (Dib, 2004).

- Hammam N'Bails: Située à 40 km au Sud-Est de la ville de Guelma, au centre de la commune de Hammam N'Bails et à 2 km de la mine du Nador. Elle est de nature sulfaté sodique, un débit constant et permanent de 5.33 l/s et une température de 45 °C.

- Hammam Mansourah: Situé à environ 29 km à l'Ouest de la ville de Bordj Bou Arréridj sur la route nationale N°5 dans le village de Manssourah. Elle est caractérisée par une température de 29 °C, un pH de 7.12 et une conductivité de 300µmho/cm, ces eaux sont de nature chlorurées sodiques.

- Hammam Sidi Trad: Situé à 1 Km de la frontière Algéro-Tunisienne, il se situe à 40 Km environs au sud d'El Tarfet à 20 km au Sud-Est de Zitouna, dans une région montagneuse isolée. Les eaux de cette source sont caractérisées par une température de 60 °C et un pH

faiblement basique (7.57) et un débit de 0.9 l/s et une conductivité de 0.5mS/cm, ils sont de nature bicarbonatée calcique (Hacene et Christian, 2007).

- Hammam Beni Salah: Situé au Sud-Est d'ElTarf sur environ 10 Km à l'Est du Chef-lieu de la Daïra de Bouhadjar. Les eaux de cette source sont caractérisées par une température de 45°C et un pH de 7.43, un débit de 0.71 l/s et une conductivité de 1.5 mS/cm. elles sont de nature bicarbonatée sodique (Hacene et Christian, 2007).

- Hammam Latrèche: Situé dans les monts de Cheffia, cette source est caractérisée par une température de 37°C, un pH de 7.47, un débit de 0.05 l/s et une conductivité de 1.9 mS/cm. Ces eaux sont de nature bicarbonatée sodique avec un dégagement de CO<sub>2</sub> libre (Hacene et Christian, 2007).

- Hammam Zatout: Se trouve près de la frontière Algéro-Tunisienne, il est situé au Sud-Ouest d'El Tarf et à 7 Km à l'Est de Bouhadjar. Il est caractérisé par une température de 46°C, un pH de 7.32, un débit de 0.36 l/s et une conductivité de 2.2 mS/cm. Ces eaux sont de nature bicarbonatée sodique (Hacene et Christian, 2007).

- Hammam Zid: Situé au Sud-Ouest d'El Tarf. Ces eaux sont caractérisées par une température de 40 °C, un pH de 6.72, un débit de 0.09 l/s et une conductivité de 2.3 mS/cm. Ces eaux sont de nature bicarbonatée sodique (Hacene et Christian, 2007).

- Hammam Galaya « W »: Situé à l'extrême Nord-Algérien à la Wilaya d'El Tarf, il est caractérisé par une température de 68°C, pH de 6.35 et une conductivité de 2.7mS/cm. Ces eaux sont de nature chlorurée sodique (Hacene et Christian, 2007).

- Hammam Galaya « E »: Situé à la Wilaya d'El Tarf, il est caractérisé par une température de 69°C, un pH de 6.59 et une conductivité de 2.7mS/cm. Ces eaux sont de nature chlorurée sodique (Hacene et Christian, 2007).

- Hammam Essalhine : Situé dans la commune d'El Hamma, à 7 kilomètres de Khenchela. Ces eaux ont une température de 70°C, un pH de 7.41 et un débit de 1400l/min. Les éléments dominants dans cette source, sont le Cl, le HCO<sub>3</sub> et le calcium. Sa composition chimique lui confère des thérapeutiques indiquées pour les maladies rhumatismales, respiratoires et dermatologiques.

- Hammam El Keria: Cette source se trouve à quelques kilomètres de la route reliant de ville de Bédjaya au village de Yakouren. Elle a une température de 44°C, un pH égal à 7.10 et une radioactivité de 0.25 nanocuries/l (Pouget et Chouchak, 1967). Ces eaux sont très peu minéralisées ont une conductivité de l'ordre de 400µmho/cm. Elles sont de nature bicarbonatée calcique (Nedjai, 1987).

- Hammam Oued Hmimine: Situé près de la commune d'Ain Cherchar au Sud-Est de la ville de Skikda et à 7 Km d'Azzaba. Cette source est de nature sulfatée, caractérisée par une température variant entre 42°C et 47°C et un débit de 2.25 l/s (Bekkouche, 2013).

- La source d'El Hamma: Située à 15 Km au Nord-Est d'Azzaba, près de la commune de Ben Azzouz et à 5 Km au Nord du village Oued El Kebir, à 2 Km de la route nationale Constantine-Annaba (Bekkouche, 2009).

### **3-3-3 Région Ouest-Algérien**

- Hammam Bouhadjar: Situé à 21 Km de la ville d'AïnTémouchent, s'élève sur une altitude de 150 mètres et s'étend au milieu des vignobles et d'oliviers sur une superficie de 603 240 m<sup>2</sup>. Cette source a une température de 70°C et une radioactivité de 22.8 nanocuries/l (Boudoukha et Athemna, 2012). Ces eaux sont de nature Chlorurées Sodiques il y a aussi une teneur remarquable en Sulfate. Les indications thérapeutiques principales sont les rhumatismes.

-Hammam Bouhanifia: Se situe à 25 Km au Sud-Ouest de Mascara, il s'étale dans un paysage sauvage dans le Tell Oranais sur les bords de l'Oued El Hammam. La station thermale qui n'est qu'à 230 mètres d'altitude est entourée de montagnes culminant à 800 mètres. Ces eaux ont une température de 70°C, un débit de 23 l/s et une radioactivité de 27 millimicrocuries/l (Boudoukha et Athemna, 2012). Ces eaux sont de nature Chloro-Sulfatées et sont agréables à déguster d'autant plus qu'elles tiennent en dissolution une grande quantité de gaz carbonique qui les rend éminemment digestibles. Les indications thérapeutiques principales sont les rhumatismes.

-Bain de la Reine: Situé à Mers-el-Kébir à 3 Kilomètres d'Oran. Il a une température de 55°C. Ces eaux sont réputées d'être efficaces contre le rachitisme.

- Hammam Boughrara: Situé à 282 mètre d'altitude à l'extrême Ouest du pays, sur les bords de l'Oued Tafna à proximité de la ville frontalière de Maghnia. Il a une température de 45°C. Ces eaux sont de nature Sulfatées et Bicarbonatées sodiques. Les indications thérapeutiques sont d'ordre rhumatologique, dermatologique, gynécologique et respiratoire.

- Hammam Rabbi: située à 20 Km de la ville de Saïda sur l'axe Saida – Oran, logé dans un site d'une beauté saisissante. Il a un débit de 8 l/s et une température de 40°C. Les eaux thermales de Hammam Rabbi, traitent les affectations dermatologiques, respiratoires et rhumatoïdes.

### **3-3-4 Région Sud-Algérienne**

- Hammam Zelfana: Située au Sud-est de Ghardaïa à 100 km du chef-lieu de la Wilaya, il culmine à 480m d'altitude et s'étend sur une superficie de 2220 km<sup>2</sup>. Les eaux de cette source

sont caractérisées par un fort débit ( $0.36 \text{ m}^3/\text{s}$ ) et une température de  $46^\circ\text{C}$  (Ouali, 1996). Ces eaux sont de nature chlorurées sodiques (Ouali *et al.*, 2007).

- Hammam Serguine: Situé dans vaste plaine de Sidi Ladjel à environ 64 Km au Sud-Ouest de la ville d'Ain Ouassera. Ces eaux sont caractérisées par une température de  $38^\circ\text{C}$ , pH varie entre 7 et 7.8, et une conductivité de  $8800 \mu\text{mho}/\text{cm}$ . Ces eaux sont de nature chlorurée sodique.

- Hammam Belaribi: Situé à environ 13 kilomètres au Nord de M'Sila à quelques centaines de mètres de la route nationale N°5. La température de cette source est de  $31^\circ\text{C}$ , son pH est entre 7 et 7.8 et sa conductivité est de  $2000 \mu\text{mho}/\text{cm}$ . Les eaux de cette source sont de nature sulfatée calcique.

- Hammam Delaa: Se trouve à environ 15 km à vol d'oiseau du Sud de Mansourah et une trentaine de kilomètres au Nord-Ouest de M'Sila. Cette source est caractérisée par une température de  $41^\circ\text{C}$ , un pH de 6.9 et une conductivité de  $3800 \mu\text{mho}/\text{cm}$ . Cette source est de nature sulfatée sodique.

- Hammam Salhin: Situé à environ 8 km de Biskra. Il a une température de  $45^\circ\text{C}$  et un débit d'environ  $1.4 \text{ l}/\text{min}$  (cahier du centenaire de l'Algérie n°V en 1930).

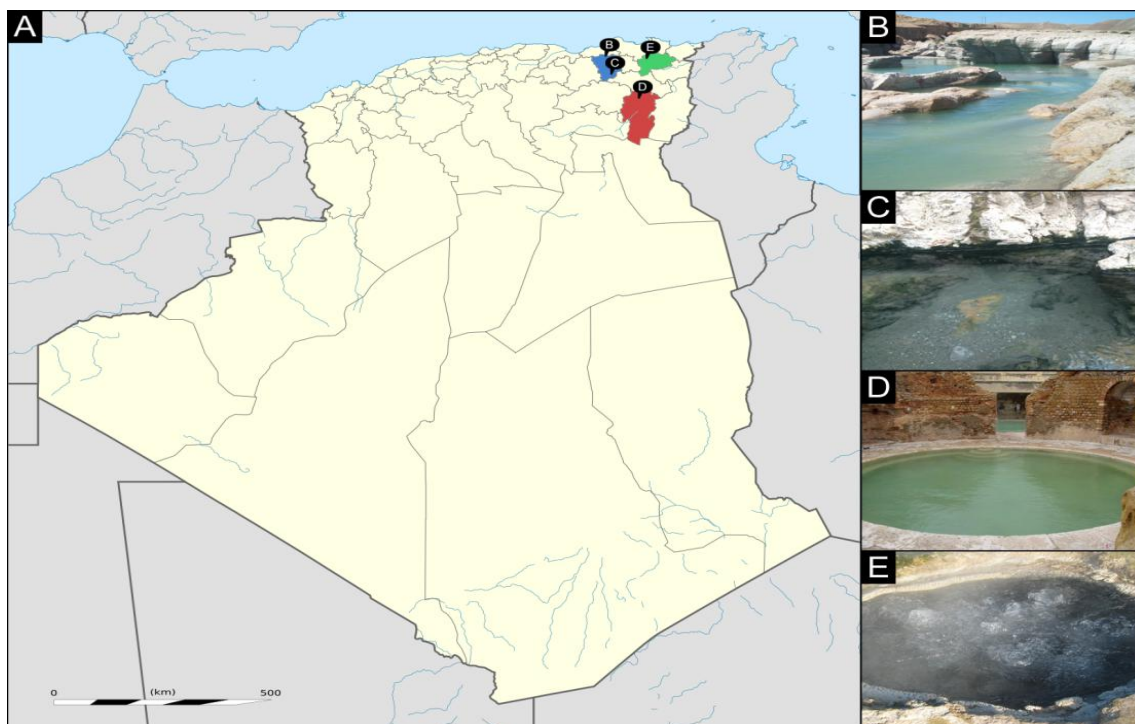
# Partie Expérimentale

---



## 1- Échantillonnage des eaux thermales

Quatre sources chaudes situées dans le Nord-est de l'Algérie ont été étudiées (**Figure 13**). Les échantillons d'eau de chaque site ont été collectés à partir des stations thermales suivantes: Hammam Béniharoun (Tleghma, ville de Mila); Hammam des Frères Chaouch (ville de Mila); Hammam Essalihine (ville de Khenchela); Hammam Debagh (ville de Guelma) (**Figure 13**). Le prélèvement est réalisé de manière aseptique dans des flacons en verre stériles de 250 ml de volume. Les flacons sont remplis jusqu'à débordement et recouvert par du papier aluminium. Les échantillons d'eau sont ensuite acheminés au laboratoire dans une glacière. Les analyses ont été effectuées dans les 24 h qui suivent les prélèvements.



**Figure 13.** Répartition géographique des sources chaudes algériennes étudiées. (A) : Les sites d'échantillonnage: Mila (en bleu), Khenchela (en rouge) et Guelma (en vert). (B) : Source chaude de Béniharoun (Mila, 36 ° 33 ' 19 " N, 6 ° 16 ' 11 " E). (C) : Source chaude des Frères Chaouch (Tleghma, Mila, 36 ° 06 ' 55 " N, 6 ° 21 ' 51 " E). (D) : Source chaude d'Essalihine (Khenchela, 35 ° 26 ' 25 " N, 7 ° 05 ' 04 " E). (E) : Source chaude Debagh (Maskoutine) (Guelma, 36 ° 27 ' 35 " N, 7 ° 16 ' 10 " E).

## 2- Isolement sélectif, purification et conservation des isolats actinobactériens

Cents microlitres de chaque échantillon d'eau ainsi que les dilutions  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  et  $10^4$  en solution saline N (NaCl à 0,85% dans de l'eau déminéralisée stérile) (Pednekar *et al.*, 2011), ont étéensemencé en surface sur des milieux de culture sélectifs: Actinomycete Isolation Agar (AIA) (Annexe 1) (Jayashree *et al.*, 1991; Uzel *et al.*, 2011), Starch Casein Agar (SCA) (Annexe 1) (Uzel *et al.*, 2011; Mohseni *et al.*, 2013) et le milieu Isolation *Streptomyces*

Project 2 (ISP2) (Annexe 1) (Mohseni *et al.*, 2013). Les milieux de cultures utilisés sont supplémentés de 25 µg/mL de nystatine (pour minimiser la contamination fongique) et 10 µg/mL d'acide nalidixique (pour inhiber la croissance des bactéries à coloration de Gram négatif) (Takizawa *et al.*, 1993; Ravel *et al.*, 1998). Les boîtes de pétri sont alors incubées pendant 7 à 30 jours à 28 °C, 37 °C et 55 °C. Les colonies obtenues sont examinées à l'œil nu et au microscope photonique. Les actinobactéries sont récupérées en se basant sur leur aspect macroscopique typique de ces bactéries. Un examen microscopique de ces isolats est effectué après coloration de Gram afin de confirmer l'aspect microscopique caractéristique des actinobactéries.

Les colonies actinobactériennes sont délicatement prélevées et repiquées sur le milieu ISP2 dépourvu d'antimicrobiens. Ces isolats sont ensuite conservés en suspension liquide composé du milieu ISP2 et du glycérol à 20 % (V/V). Les tubes ainsi préparés sont conservés à -20 °C (Isik *et al.*, 1999).

### **3- Identification moléculaire des isolats actinobactériens**

Les isolats obtenus sont identifiés par une méthode moléculaire basée sur le séquençage et l'analyse du gène ARNr 16S en utilisant des amorces spécifiques aux *Actinobacteria* (Song *et al.*, 2009).

#### **3-1 Lyse cellulaire**

L'ADN génomique est obtenu à partir des colonies actinobactériennes fraîches cultivées sur milieu ISP2. Une colonie est prélevée délicatement et introduite dans un tube eppendorf contenant 500 µL d'eau bi-distillée stérile. Après une homogénéisation au vortex, le tube est incubé dans un thermocycleur à 98°C pendant 10 minutes ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 g. Le surnageant résultant est directement utilisé pour la PCR.

#### **3-2 Amplification par PCR**

Les fragments du gène de l'ARNr 16S d'environ 635 pb ont été amplifiés en utilisant les amorces spécifiques aux actinobactéries suivantes: -SC-ACT-235-aS-20 (5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3') (Forward) et -SC-ACT-878-Aa-19 (5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3') (Reverse) (Song *et al.*, 2009).

La PCR est réalisée dans un thermocycleur (BIO-RAD T100), dans un volume total de 50 µL contenant: 1 µL de lysat de cellules, 10 µL de tampon Phusion HF (5×), 1 µL de dNTP

(10 mM), 1  $\mu$ L de chaque amorce (10  $\mu$ M), 1,5  $\mu$ L de DMSO (5%) et 0,5  $\mu$ L d'ADN polymérase Phusion (0,02  $\mu$ L). Afin d'exclure toute contamination potentielle lors de l'amplification PCR, une amplification PCR négative (control négatif) avec des amorces universelles a été réalisée.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Thermocycleurs Eppendorf Mastercycler Nexus), selon le protocole suivant: un cycle initial de dénaturation à 98 °C pendant 30 secondes, 35 cycles comprenant une dénaturation à 98 °C pendant 10 secondes, une hybridation à 59 °C pendant 30 secondes, une extension à 72 °C pendant 15 secondes, et une étape finale d'extension à 72 °C pendant 7 minutes.

### **3-3 Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les produits de PCR sont visualisés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Agarose, High resolution, for molecularbiology, Sigma-Aldrich), préparé dans le tampon TAE 1X. Les échantillons des produits PCR, le control négatif et le marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 1Kb DNA Leader, Thermo Scientific™) ont été additionnés de GelGreen 1X [pour substituer le bromure d'éthidium (BET)] chacun, et migrés pendant 2h à 60 volts. Après migration le gel est exposé à la lumière ultraviolette (UV) afin de visualiser les bandes d'ADN amplifiées. Les produits de PCR ont été purifiés selon le protocole recommandé par le fabricant de «Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction kit ». La qualité et la taille des produits PCR purifiés ont été vérifiés par une autre électrophorèse en suivant les mêmes conditions décrites ci-dessus.

### **3-4 Séquençage du fragment d'ARNr 16S et analyse phylogénétique**

Le séquençage des produits de PCR purifiés est effectué au SAI (Servizos de Apoio á Investigación) de l'Universidade da Coruña, Espagne.

Toutes les séquences obtenues sont analysées et éditées en utilisant le logiciel Bioedit version 7.2.5 (Hall, 1999) et le logiciel Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation). Les séquences d'ARNr 16S obtenues ont été comparées aux séquences homologues des espèces de références repertoriées sur les bases de données EzBioCloud et par le NCBI GenBank « Basic SearchToolAlignment » (BLAST) afin de déterminer leur affiliation phylogénétique.

L'arbre phylogénétique est construit à l'aide du programme (MEGA 5.0) (Tamura *et al.*, 2011), par la méthode Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987) et la validation statistiques des liens phylogénétiques établis et effectuée par le test du 1000 Bootstrap (Felsenstein, 1985).

#### **4- Caractérisation des souches actinobactériennes sélectionnées**

Les isolats actinobactériens dénommés (H, J, K et N4) ont été sélectionnés pour des études morphologiques, biochimiques et physiologiques.

##### **4-1 Préparation des inocula des actinobactéries sélectionnés**

###### **4-1-1 inoculum général**

Les isolats actinobactériens conservés, sont ensemencés en stries serrées sur milieu gélosé (ISP2) (Annexe 1). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 14 jours. A partir de ces boîtes, une suspension dense de fragments mycéliens et de spores est préparée. A l'aide d'une anse de platine les colonies sont raclées puis elles sont introduites dans un tube contenant de l'eau distillée stérile.

###### **4-1-2 Préparation de la biomasse bactérienne**

Des Erlenmeyer de 1000 ml contenant 500 ml de milieu liquide ISP2 (Annexe 1) sont inoculés séparément par un fragment de colonie des quatre isolats sélectionnés, puis incubé à 30°C pendant 4 jours sous agitation. Après incubation, la culture est conditionnée dans des tubes Falcon stériles puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite écarté, le culot est lavé deux fois à l'eau distillée stérile. Les tubes ainsi préparés ont été surgelés en les plaçant dans de l'azote liquide jusqu'à congélation. Les tubes sont ensuite conservés à -80°C. La biomasse est utilisée pour l'étude chimiotaxonomique.

##### **4-2 Caractérisation morphologiques par microscope électronique**

La microscopie électronique à balayage (SEM) a été réalisée dans le SAI (Servizos de Apoyo á Investigación) à l'Universidad da Coruña, Espagne, afin d'examiner la morphologie des hyphes aériens et les chaînes de spores des actinobactéries. Pour cela, la technique de culture sur lamelle (Kawato et Shinobu., 1959) a été adoptée, suivant le protocole préconisé par Williams et Davies (1967). En premier lieu, des lamelles en verre sont stérilisées par autoclavage. Séparément, les lamelles ont été insérées délicatement à un angle d'environ 45° dans des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé ISP2, jusqu'à ce que environ la moitié de la

lamelle se trouve incrustée dans le milieu. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, une goutte de l'inoculum correspondant à chaque isolate est déposée et étalée tout au long de la ligne où la surface supérieure de la lamelle rencontre le milieu gélosé. Après 14 jours d'incubation à 30°C, les lamelles sont retirées délicatement de la gélose et envoyées au service SAI (Servizos de Apoyo á Investigación), pour établir une microscopie électronique à balayage selon le protocole de Kawato et Shinobu., (1959) et Williams et Davies (1967).

### **4-3 Caractérisation physiologique**

#### **4-3-1 La croissance à différentes températures**

Les isolats d'actinobactéries sélectionnés sont ensemencés sur le milieu de culture gélosé ISP2 par une strie verticale au centre, à raison de trois boîtes de Pétri par souche, pour chaque température d'incubation. La croissance à 30 et 37°C est mesurée après 7 et 14 jours, celle à 4 et 14°C est mesurée après 6 semaines (Williams *et al.*, 1983). Concernant la croissance à 50 °C, le protocole décrit par Gordon *et al.*, (1974) a été adopté selon la technique suivante : Les cultures actinobactériennes sont inoculées dans des tubes contenant du milieu ISP2 liquide et chauffées dans un bain marie à 50 °C. Les cultures sont transférées dans un incubateur à la même température et incubées pendant 8 heures (Gordon *et al.*, 1974). Les tubes sont rapidement refroidis, et incubés à 28 °C pendant 3 semaines. La croissance est déterminée en utilisant un spectrophotomètre (Eppendorf BioPhotometer D30). Pour faciliter la lecture dans le spectrophotomètre, l'aspect filamenteux des actinobactéries est brisé en ajoutant des billes de verre stériles aux cultures suivies d'une agitation vigoureuse.

#### **4-3-2 La croissance à différents pH**

Les isolats d'actinobactéries sélectionnés sont ensemencés sur le milieu de culture gélosé ISP2 par une strie verticale au centre, à raison de trois boîtes de Pétri par souche. La croissance des souches est testée à des pH de (4.3, 7.3 et 10.3), elle est estimée après 7 et 14 jours (Williams *et al.*, 1983).

#### **4-3-3 Tolérance au chlorure de sodium**

Des tubes contenant le milieu ISP2 liquide contenant des concentrations croissantes de chlorure de sodium (NaCl) allant de (1% jusqu'à 10%) (P/V) sont ensemencés par l'inoculum correspondant à chaque souche. Les tubes sont incubés à 30°C avec agitation pendant 14 jours. La croissance est estimée en utilisant un spectrophotomètre. La tolérance maximale au

chlorure de sodium correspond à la dernière concentration présentant encore une croissance (Shirling et Gottlieb, 1966).

#### **4-3-4 Croissance en présence des lysozymes**

Une solution stock de lysozyme est préparée en dissolvant 0,1 g de lysozyme (6 000 à 10 000 U/mg, de Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio) dans 100 ml d'eau distillée stérile. La solution est stérilisée par filtration à travers un filtre à membrane millipore à 0,22 µm, stockée à 4 °C et jetée après 2 semaines. Un volume de 5 ml de la solution stock de lysozyme est mélangé avec 95 ml de bouillon de glycérol (Annexe 1) et distribuée de manière aseptique dans des tubes en verre. Un tube de bouillon de lysozyme (300 à 500 U/ml) et un tube contenant le bouillon de glycérol exempt de lysozyme (pris comme témoin) ont été inoculés pour chaque souche. La croissance a été estimée à l'aide d'un spectrophotomètre, après 2 et 4 semaines d'incubation à 28 °C avec agitation (Gordon *et al.*, 1974).

#### **4-3-5 Croissance en présence d'antibiotiques**

Les souches ont été testées pour leurs capacités à croître en présence de six antibiotiques (la Rifamycine 50µg/ml, l'Antimycine 30µg/ml, l'Ampicilline 10µg/ml, le Chloramphénicol 30µg/ml, la Kanamycine 30µg/ml et la Tétracycline 30µg/ml) (Williams *et al.*, 1983). Les solutions stock de chaque antibiotique sont préparées en dissolvant 0,1 g d'antibiotique dans 50 ml d'eau distillée stérile. Les solutions sont ensuite stérilisées par filtration à travers un filtre à membrane millipore 0,22µm, et stockées à 4°C. Un volume mesuré correspondant à la concentration finale de chaque solution d'antibiotique est mélangé au milieu de culture gélosé ISP2 de manière aseptique. Les boîtes de pétri sont doncensemencées par une strie verticale centrale à raison de 3 boîtes de pétri par antibiotique et incubées à 28°C pendant 7 et 14 jours.

#### **4-4 Caractérisation métabolique par les Galeries Api**

La caractérisation biochimique des souches est étudiée en utilisant trois galeries Api (BioMérieux) différentes: ApiCoryne, Rapid ID 32 STREP et ApiZym; souvent utilisées pour ce groupe bactérien (Hoyles *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2017a, b). A partir de cultures fraîches de chaque souche, des suspensions sont préparées dans une solution N-saline à 0,85%. Les inoculations de ces galeries Api, ont été réalisées selon les protocoles recommandés par le fabricant.

## **4-5 Caractérisation chimiotaxonomique**

### **4-5-1 L'acide diaminopimélique (DAP)**

La forme isomérique de l'acide diaminopimélique (DAP) est déterminée en plaçant une ou deux colonies dans un tube avec 0,1 ml de HCl 6N. Le tube scellé est chauffé par autoclavage 15 min à 121 °C (Tisdall et Anhalt, 1979). Après refroidissement, 1 µl de l'hydrolysate est placé directement sur une feuille de cellulose (Microcrystalline cellulose f, Tokyo Kasei Co., Ltd.). Un volume de 1 µl de 0,01 M DL-DAP (Sigma Chem. Co.), qui contient à la fois les deux isomères L- et méso-DAP, est déposé sur la même feuille comme standard. Une Chromatographie ascendante est effectuée sur le système de solvant eau distillée-méthanol-6 N HCl-pyridine (80: 26: 4:10, v/v) (Staneck et Roberts, 1974) pendant 3 heures. Une fois la feuille séchée, elle est pulvérisée avec une solution acétonique à 0,2 % de ninhydrine et chauffée à 100 °C pendant 2 minutes pour révéler les taches (Hasegawa *et al.*, 1983). Les différentes formes de l'acide diaminopimélique se caractérisent par une couleur grise-verte ou jaunâtre. Les taches d'acides aminés vont apparaître violettes ou rouges et migrent avant la tache de DAP.

### **4-5-2 Caractérisation des sucres de la paroi**

Pour déterminer les sucres de la paroi, une ou deux colonies de chaque culture sont placées dans un tube avec 0,1 ml de HCl 0,25 N. Le tube scellé est chauffé pendant 15 minutes à 121 °C. Après son refroidissement, 2 µl de chacun des hydrolysats de culture est déposé sur une mince feuille de cellulose (cellulose microcristalline f) avec 1 µl de la solution standard, qui contient le galactose, le glucose, le mannose, l'arabinose, la xylose et le ribose chacun à une concentration de 1%. Une Chromatographie ascendante est effectuée avec un système de solvant de n-butanol-eau distillée-pyridine-toluène (10:6:6:1, v/v) pendant 3 heures (Staneck et Roberts, 1974). Après que la feuille est séchée par un courant d'air, les taches sont visualisées par pulvérisation avec de l'aniline acide phtalique (Lechevalier, 1968) et chauffées à 100 °C pendant 4 minutes (Staneck et Roberts, 1974; Hasegawa *et al.*, 1983).

### **4-5-3 Caractérisation des lipides polaires, des acides gras et des ménaquinones**

L'analyse des lipides polaires, des acides gras et des ménaquinones a été réalisée par le service d'identification du DSMZ, Braunschweig, Allemagne, en suivant les méthodes décrites ci-dessous :

- Les lipides polaires sont extraits de 100 mg de biomasse lyophilisée en suivant la méthode décrite par Tindall (1990a; 1990b) et en utilisant un mélange chloroforme:méthanol:NaCl aqueux à 0,3% 1:2:0,8 (v/v/v) (Bligh et Dyer, 1959). Le solvant d'extraction est agité pendant une nuit et les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation. Les lipides polaires sont récupérés dans la phase chloroformique en ajustant le mélange chloroforme:méthanol:NaCl aqueux à 0,3 % 1:1:0,9 (v/v/v).

Les lipides polaires sont ensuite séparés par chromatographie bidimensionnelle en couche mince sur gel de silice (Macherey-Nagel Art. No. 818 135). La première direction est développée en chloroforme:méthanol:eau (65:25:4, v/v/v), et la seconde en chloroforme:méthanol:acide acétique:eau (80:12:15:4, v/v/v/v). Le matériel lipidique total a été détecté en utilisant de l'acide molybdato-phosphorique et des groupes fonctionnels spécifiques détectés en utilisant des réactifs de pulvérisation spécifiques pour des groupes fonctionnels définis (Tindall *et al.*, 2007).

-Les esters méthyliques d'acides gras sont obtenus à partir de 40 mg de biomasse lyophilisée grattées en boîtes de Pétri par saponification suivie par une méthylation et extraction en suivant les modifications mineures de la méthode de Miller (1982) et Kuykendall *et al.*, (1988). Les mélanges d'esters méthyliques d'acides gras sont séparés en utilisant le Sherlock Microbial Identification System (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711 USA) qui consistait en un chromatographe en phase gazeuse (Agilent modèle 6890N) équipé d'une colonne capillaire 5% phényl-méthyl silicone (0,2 mm x 25 m), un détecteur à ionisation de flamme, un échantillonneur automatique (Agilent modèle 7683A) et un ordinateur HP avec base de données MIDI (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Californie, États-Unis). Les pics sont automatiquement intégrés et les noms et pourcentages d'acides gras calculés par le logiciel standard MIS (ID microbien). Les paramètres de chromatographie en phase gazeuse sont les suivants : gaz vecteur, hydrogène ultra-pur ; pression en tête de colonne 60kPa; volume d'injection 2 µl; rapport de division de colonne, 100:1; purge du septum 5 ml/min; température de la colonne, 170 à 270°C à 5°C/min; température de l'orifice d'injection, 240 °C ; et température du détecteur, 300°C.

-Les lipoquinones respiratoires sont extraites de 100 mg de biomasse lyophilisée en utilisant la méthode décrite par Tindall (1990a; 1990b). Les quinones respiratoires sont extraites à l'aide de méthanol:hexane (Tindall, 1990a, 1990b), suivi d'une séparation de phase dans l'hexane. Les lipoquinones respiratoires sont séparées en leurs différentes classes



(ménaquinones, ubiquinones, etc.) par chromatographie en couche mince sur gel de silice (Macherey-Nagel Art. No. 805 023), en utilisant l'hexane:tert-butylmethylether (9:1 v/v) comme solvant. Les bandes absorbant les UV correspondant aux différentes classes de quinones (par exemple les ménaquinones ou les ubiquinones) ont été retirées de la plaque et analysées plus avant par HPLC. Cette étape est réalisée sur une HPLC LDC Analytical (Thermo Separation Products) équipée d'une colonne en phase inverse (Macherey-Nagel, 2 mm x 125 mm, 3 µm, RP18) en utilisant du méthanol:heptane 9:1 (v/v) comme éluant.

#### **4-6 Détermination du G+C %**

##### **4-6-1 Extraction de l'ADN génomique**

L'ADN des souches sélectionnées est extrait en suivant le protocole suivant : À partir des cultures pures et matures des souches sélectionnées, ont été cultivées dans des Erlenmeyer de 1000 ml de volume, contenant chacun 500 ml du milieu de culture liquide ISP2. Les Erlenmeyer sont incubés à 28 °C pendant 4 jours sous agitation de 200 rpm. Les cultures sont ensuite centrifugées à 10 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est écarté et le culot est rincé deux fois à l'eau distillée stérile. La biomasse est transférée dans un tube Falcon et surgelé dans de l'azote liquide. 0,1 g de la biomasse est transféré dans un tube Eppendorf contenant 500µl du tampon TE additionné de lysozyme (20 mg / ml). Le tube est incubé à 37°C pendant 30 minutes. Après incubation et refroidissement, 20µl de SDS à 10% (p/v) et 20µl de protéinase K sont ajoutés dans le tube suivi d'une incubation à 55°C pendant 30 minutes.

Le lysat est refroidi et extrait une autre fois avec un volume égal de solution phénol:chloroforme (1:1, v/v) à 10 000 g pendant 5 minutes. La phase aqueuse est transférée avec précaution dans un autre tube Eppendorf et l'ADN est précipité en ajoutant 90% d'éthanol, en le maintenant à -20 °C pendant 30 minutes. Le culot est formé par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes. Le culot est ensuite lavé deux fois avec de l'éthanol à 90% et dissous dans le tampon TE. Pour obtenir de l'ADN sans ARN, 20 µl de solution de RNase (20 µg / ml) est ajoutée, puis incubé à 37 °C pendant 1 heure. L'échantillon est de nouveau extrait avec un volume égal de phénol:chloroforme et précipité comme indiqué ci-dessus. La pureté et la concentration sont vérifiées à l'aide d'un spectrophotomètre (EppendorfBioPhotometer D30) (Kumar *et al.*, 2010).

#### 4-6-2 Estimation du G+C%

Le pourcentage de la teneur en G+C dans les échantillons d'ADN des souches est estimé en suivant une technique fluorimétrique. L'ADN génomique des souches est spécifiquement marqué avec un colorant fluorescent « SYBR GREEN I » (Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix). La dénaturation thermique de l'ADN est suivie en mesurant la diminution de fluorescence à l'aide d'un thermocycleur PCR en temps réel (Eco™ Real-Time PCR System) (Gonzalez et Saiz-Jimenez., 2002). La souche *E. coli* DH10B est utilisée comme témoin.

#### 4-7 Criblage de l'activité enzymatique

Les souches sélectionnées ont été criblées pour révéler leur potentiel enzymatique. Les enzymes recherchées sont : la lipase, la cellulase, la xylanase et la protéase.

##### 4-7-1 Lipase

Des boîtes de pétri contenant le milieu de culture gélosé Luria-Bertani (LB) modifiées (Annexe 1) additionnées de la tributyrine émulsionnée à 1% (v/v) comme substrat, sont ensemencées par des spots et incubées à 37°C pendant 7 jours. L'apparition de halos clairs autour des colonies individuelles indique l'hydrolyse de la tributyrine et sont donc considérés comme des souches productrices de lipase.

##### 4-7-2 Cellulase et xylanase

Chaque souche est ensemencée par des spots sur milieu gélosé Luria-Bertani (LB) en boîte de pétrie, additionnées individuellement des deux substrats chromogènes insolubles « AZCL-HE Cellulose » et « AZCL-Xylane » qui ont été solubilisés dans de l'éthanol à 96% et ajoutés au milieu de culture gélosé LB à une concentration de 0,1% (p/v). Les boîtes de pétri sont incubées à 37 °C pendant 7 jours. L'apparition d'une zone de couleur bleue autour des colonies indique l'hydrolyse de l'AZCL-HE Cellulose ou de l'AZCL-Xylane, et ils sont considérés comme des souches produisant de la cellulase ou de la xylanase.

##### 4-7-3 Protéase

Le criblage de l'activité protéasique des isolats est établie en détectant la fluorescence émise lorsque la culture est incubée en présence des substrats fluorescents contenus dans le kit EnzChek® Protease Assay Kits E6638 Sondes moléculaires (technologies de détection

Invitrogen de Thermo Fisher Scientific®). Les souches sont cultivées en milieu liquide Luria-Bertani (LB). Un volume de 500 µL de chaque souche est transféré dans un tube Eppendorf et centrifugés à 3000 g pendant 5 minutes. 10 µL du surnageant de chaque suspension est prélevé et chargé dans une plaque noire à fond rond de 384 puits (Corning) pour détecter la fluorescence, qui contenait 10 µL de solution du substrat fluorescent (EnzChek® Protease Assay Kit [fluorescence verte]). La microplaque est incubée dans obscurité à température ambiante (20-25°C) pendant 30 minutes. La fluorescence est mesurée en utilisant le spectrofluorimètre Synergy H1 Hybrid Reader (Biotek®). Ce dispositif dispose d'un lecteur de microplaques et est proportionnelle à l'activité protéasique présente ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp06638 .pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp06638.pdf)). Afin de sélectionner les puits positifs, un critère est retenu qui consiste à prendre comme valeurs positives les mesures de fluorescence supérieures à une valeur seuil. La valeur seuil est le double de l'écart type sur la valeur moyenne de tous les puits sur la même plaque (Nyssönen *et al.*, 2013).

#### **4-8 Criblage de l'activité antimicrobienne**

##### **4-8-1 Recherche de l'activité antibactérienne**

###### **4-8-1-1 Inocula des bactéries-tests**

L'activité antibactérienne des isolats sélectionnés est recherchée contre des bactéries à coloration de Gram positif : *Staphylococcus sp.* et *Bacillus sp.* et des bactéries à coloration de Gram négative (*Morganella sp.*, *Proteus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* et *Escherichia coli*) obtenues auprès de l'institut Pasteur à ALGER et le CHU de Constantine. A partir d'une culture de 18 à 24 h sur le milieu gélose nutritive (Annexe 1), une suspension de chaque bactérie-test est préparée en eau physiologique (0,9 % NaCl). La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile en la comparant au fur et à mesure à la solution 0,5 de MacFarland (calibré à une densité optique égale à 0,2 à 650 nm), afin d'obtenir une concentration finale de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Cette suspension bactérienne est ensemencée par inondation sur le milieu Mueller- Hinton (Annexe 1) (Cavalla et Eberlin, 1994).

###### **4-8-1-2 Techniques des cylindres d'agar**

Les isolats actinobactériens sélectionnés sont ensemencés en stries serrées sur le milieu ISP2 gélosé puis incubées à 28 °C pendant 7 jours. Des cylindres d'agar de 3 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile et soigneusement déposés à la

surface des boîtes contenant le milieu Muller-Hinton, préalablement ensemencé par les bactéries-test par inondation. Les boîtes sont ensuite placées à 4°C pendant 4 h pour permettre une bonne diffusion des substances actives, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24h. Les diamètres sont ensuite mesurés.

#### **4-8-2 Recherche de l'activité antifongique**

La mise en évidence de l'activité antifongique des souches actinobactériennes est réalisée par la technique des cylindres d'agar comme décrite dans la section précédente, contre les champignons filamenteux pathogènes *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* (obtenus auprès du département de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Frères Mentouri Constantine 1).

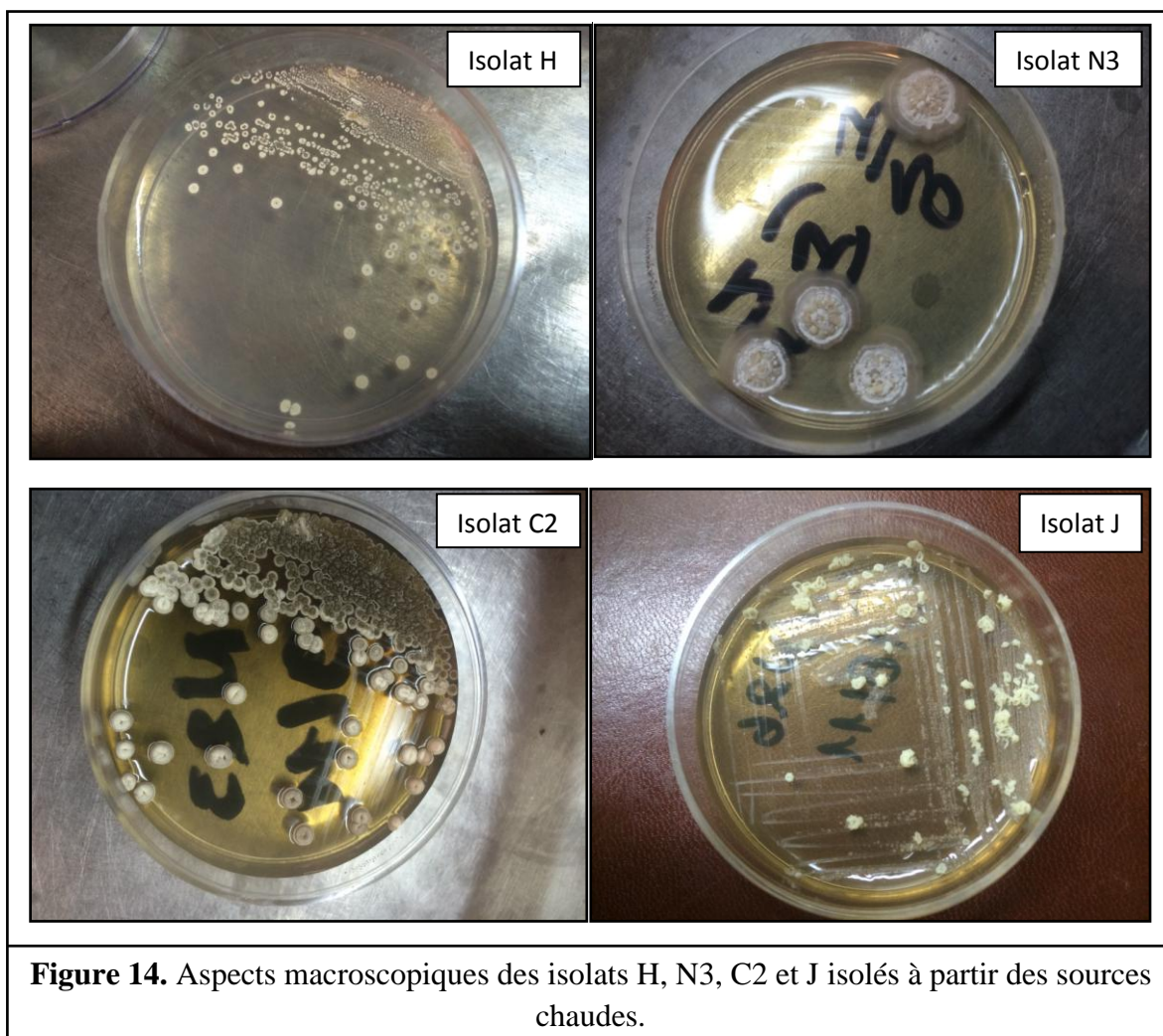
L'activité antifongique est testée sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe 1) et la mesure des zones d'inhibition est effectuée après 48 h d'incubation à 28°C.

## Résultats et discussion

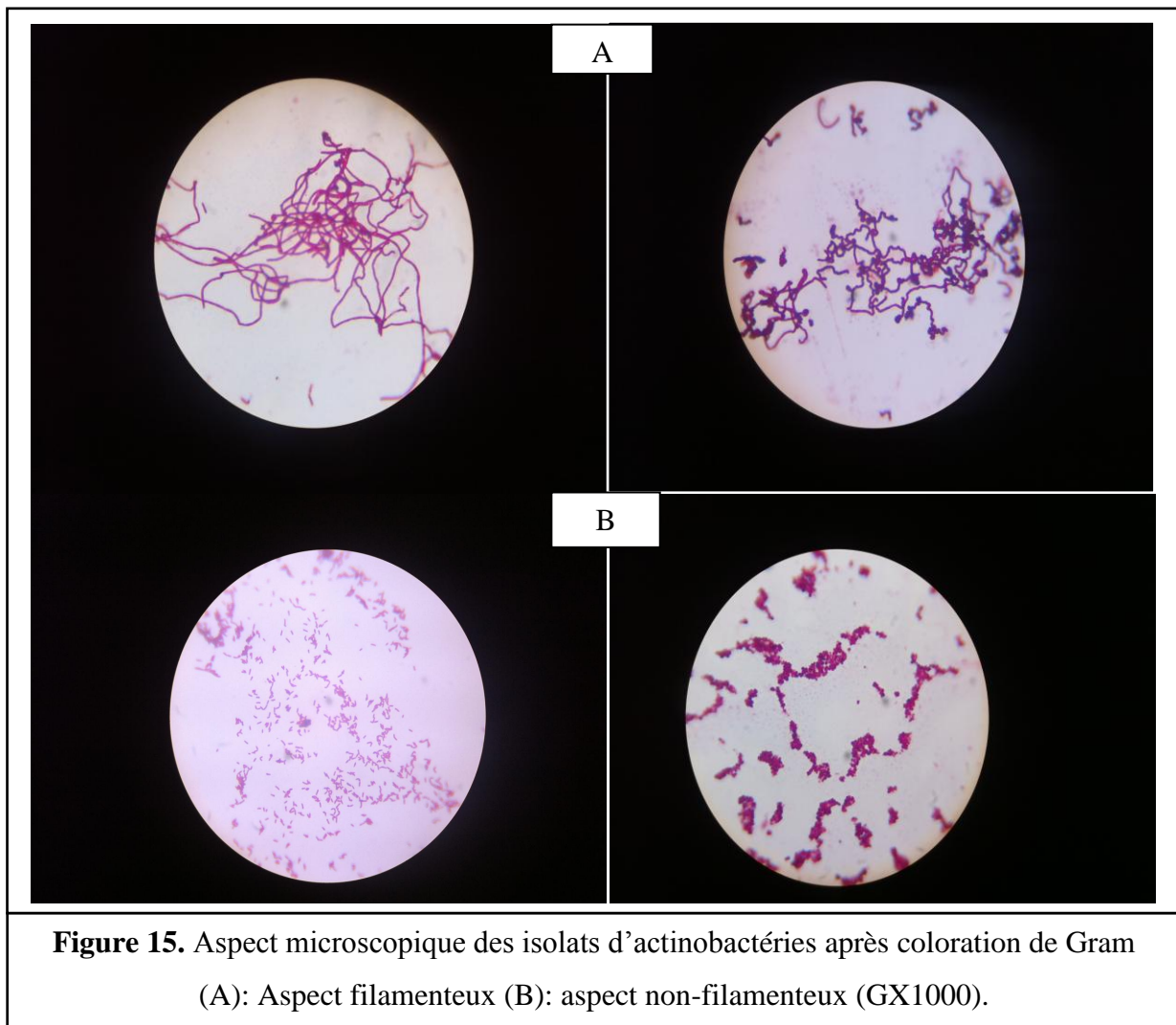
---

## 1- Isolement

Les isolats obtenus à partir des sources thermales étudiées ont révélé la présence d'actinobactéries. Les colonies isolées sont apparues après 3 à 4 semaines d'incubation sur les milieux d'isolement sélectifs (AIA et SCA) additionnés de 25 $\mu$ g/ml de nystatine et de 10 $\mu$ g/ml d'acide nalidixique. Ces actinobactéries sont reconnus par leur aspect macroscopique atypique (**Figure 14**) et par le diamètre des colonies qui est de 1 à 7 mm. En outre, la majorité des colonies sont compactes et s'incrudent dans la gélose. Les colonies sont souvent poudreuses et peuvent avoir un aspect filamenteux. Il y a présence dans certaines colonies de mycéliums aériens et de mycéliums végétatifs. L'observation microscopique des isolats a révélé la présence des aspects filamenteux ou non filamenteux avec une coloration de Gram positive (**Figure 15**). Cette pré-sélection confirme que ces isolats ressemblent du point de vue macroscopiques et microscopiques aux actinobactéries.



**Figure 14.** Aspects macroscopiques des isolats H, N3, C2 et J isolés à partir des sources chaudes.



**Figure 15.** Aspect microscopique des isolats d'actinobactéries après coloration de Gram (A): Aspect filamenteux (B): aspect non-filamenteux (GX1000).

Au total, vingt-neuf isolats d'actinobactéries présentant des aspects culturels et morphologiques différents ont été obtenus et ceux à des températures d'isolement de 28 °C, de 37 °C et de 55 °C. Vingt-deux isolats proviennent de l'eau du Hammam des Frères Chaouch (Tleghma, Mila), quatre isolats du Hammam Bénéharoun (Bénéharoun, Mila) et trois isolats du Hammam Essalihine (khenchela), alors que dans nos conditions d'isolement aucun isolat n'a été isolé des eaux du Hammam Debagh (Guelma) (**Tableau 7**). Il serait au passage, intéressant de varier les conditions d'isolement, afin de confirmer ou infirmer ce résultat.

Le milieu SCA a permis d'isoler 59% des isolats actinobactériens à partir des eaux thermales étudiées. Le milieu AIA a favorisé l'isolement des 41% d'isolats restants. Aucun isolat actinobactérien n'a pu être isolé à partir du milieu ISP2 (**Tableau 7**). Contrairement aux autres travaux, le milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966) a été utilisé avec succès dans plusieurs travaux d'isolement des actinobactéries à partir des eaux et des sols (Xu *et al.*, 1998; Mohseni *et al.*, 2013; Ronoh *et al.*, 2013; Benhadj *et al.*, 2019). Selon d'autres chercheurs, ce

milieu est plus adapté à l'étude des caractéristiques culturelles des actinobactéries (Shirling et Gottlieb, 1966; Baskaran *et al.*, 2011) et à la purification et la conservation de ces bactéries (Devi *et al.*, 2013; Azimi *et al.*, 2017).

**Tableau 7 :** Description des sites d'échantillonnage, nombre et pourcentage d'isolats obtenu par site et par températures d'incubation.

Sites d'échantillonnage	Localisation GPS	pH	Température	Nombre d'isolats par milieu d'isolement			Pourcentage d'isolats par température d'incubation			Pourcentage des isolats d'actinobactéries isolés
				AIA	SCA	ISP2	28°C	37°C	55°C	
Hamam des Frères chaouch (ville de Mila)	36°06'55'' North 6°21'51'' East	7.6	86°C	6	16	0	26%	26%	20%	75.86%
Hamam Debagh (ville de Guelma)	36°27'41'' North 7°15'49'' East	7.5	98°C	0	0	0	-	-	-	-
Hamam Béniharoun (ville de Mila)	36°33'19'' North 6°16'11'' East	7.6	45°C	4	0	0	6%	3%	3%	13.79%
Hamam Essalihine (ville de Khenchela)	35°26'25'' North 7°05'04'' East	7.4	70°C	2	1	0	6%	3%	0%	10.34%

Ces résultats montrent également, que les deux milieux de culture SCA et AIA sont les plus appropriés pour l'isolement des actinobactéries à partir de ces sources thermales. Le milieu SCA contient de l'amidon et de la caséine qui sont connus pour être favorables à la croissance des actinobactéries, préférentiellement à d'autres bactéries (Cavalla et Eberlin, 1994; Lee *et al.*, 2014). Les performances du milieu AIA peuvent s'expliquer par la présence de glycérol dans le milieu, qui est utilisé par la plupart des actinobactéries comme source de carbone (Oskay *et al.*, 2004). Il contient également du propionate de sodium qui agit comme un agent antifongique supplémentaire à la nystatine ajoutée au milieu. Par conséquent, il élimine les champignons invasifs et compétitifs pour les actinobactéries (Cavalla et Eberlin, 1994). De plus, la transparence de ce milieu, facilite l'observation des colonies actinobactériennes. Dans la littérature, la sélection des actinobactéries est en faveur des milieux qui contiennent principalement du glycérol, de l'amidon, de la caséine, de la chitine, de l'asparagine, de l'arginine, et du nitrate (Cavalla et Eberlin, 1994; Jihani *et al.*, 2012;



Siddique *et al.*, 2014). Ces composés favorisent les actinobactéries et sont moins favorables à la croissance des autres bactéries (Cavalla et Eberlin, 1994). D'autre part, l'addition au milieu d'isolement, des substances antifongiques et antibactériennes (contre les bactéries à coloration de Gram négative), augmente le nombre des colonies actinobactériennes isolées, en inhibant le développement des flores fongiques antagonistes (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1990 ; Takizawa *et al.*, 1993). La composition chimique des deux milieux (SCA et AIA), utilisés dans cette étude correspond très bien aux recommandations de la plus part de ces chercheurs.

En outre, il apparaît clairement, que l'isolement de ces bactéries varie aussi en fonction de la température d'incubation et de la composition chimique de la source thermale. Nos résultats, montrent que les eaux thermales qui ont permis l'isolement d'un grand nombre d'isolats actinobactériens, proviennent de la source chaude de Frères Chaouch et de la source chaude de Béniharoun avec respectivement 76% et 14% du total des isolats. Ces eaux partagent des points en commun tel que la nature ferrugineuse carbonatée calcique, un pH légèrement alcalin de 7,6 ainsi que le même emplacement géographique (wilaya de Mila). La source chaude Essalihine a un caractère sulfureux avec un pH de 7,4 et une température de 70°C. Cette source offre seulement 10% d'isolats actinobactériens. Les résultats montrent cependant une absence d'actinobactéries dans l'eau de la source thermale la plus chaude en Algérie Debagh (98°C), qui est riche en chlorure, en sulfate et en sodium avec un pH de 7,3 (Bouanane *et al.*, 2011). Nos résultats s'accordent parfaitement avec des études semblables antérieures (Fenchel, 2003; Whitaker *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2009) qui affirment que la nature chimique des eaux, le pH, l'emplacement géographique ainsi que la température sont des paramètres qui jouent un rôle important dans la présence de ces bactéries dans les sources chaudes.

Le nombre faible d'actinobactéries présent dans ces biotopes peut être expliqué d'une part, par la température très élevée de ces écosystèmes très hostiles. En plus, l'isolement effectué à partir des eaux et non pas les sédiments ou le sol des sources thermales, constituent une autre raison de ce faible nombre d'isolats. Ce résultat est en parfait accord avec ceux de Chaudhary et Prabhu (2016) qui ont constaté que les sédiments des sources thermales testées offrent une plus grande quantité et une plus grande diversité actinobactérienne par rapport aux échantillons d'eau (Chaudhary et Prabhu, 2016). Il est à noter que la majorité des travaux récents sur l'isolement des actinobactéries à partir des sources thermales ont été réalisés sur des échantillons de sédiments (Song *et al.*, 2009; Uzel *et al.*, 2011; Thawai, 2012; Liu *et al.*, 2016). De ce fait, il est préférable de varier les échantillons et établir l'isolement à partir des

échantillons d'eau, des sédiments ou encore des sols avoisinants les sources thermales, pour pouvoir isoler un nombre considérable d'isolats actinobactériens.

La caractérisation préliminaire de ces isolats par l'étude des caractères macro et micro-morphologique est d'après nous, suffisante pour confirmer l'appartenance de certains isolats au phylum *Actinobacteria*. Ces observations peuvent quelque fois nous informer sur les genres actinobactériens les plus connus. En effet, la majorité des isolats obtenus dans cette étude sont des colonies incrustées, irrégulières de surface pulvérulente ou rugueuse, pigmentée, possédant des mycéliums aériens et celui du substrat très évolués, complexes et persistants. Les hyphes des mycéliums aériens sont constitués par de longues chaînes de spores droites, flexueuses ou légèrement enroulées, le mycélium du substrat est sans fragmentation. Ces caractéristiques morphologiques orientent l'identification vers le genre *Streptomyces* (Holt *et al.*, 1994; Goodfellow *et al.*, 2012). L'isolat B forme des colonies de couleur rose saumon, rondes, irrégulière de grande taille et lisse avec une texture mucoïde et une morphologie cocoïde qui caractérisent le genre *Rhodococcus*. Le reste des isolats, n'a pu être identifié selon ces caractères morphologiques.

Il en ressort de cette étude, que les actinobactéries sont présents dans ces habitats hydriques de l'est de l'Algérie. Ce résultat est très important et innovant, car selon nos connaissances, les investigations qui montrent la présence des actinobactéries dans les eaux thermales, sont très rares dans le monde entier.

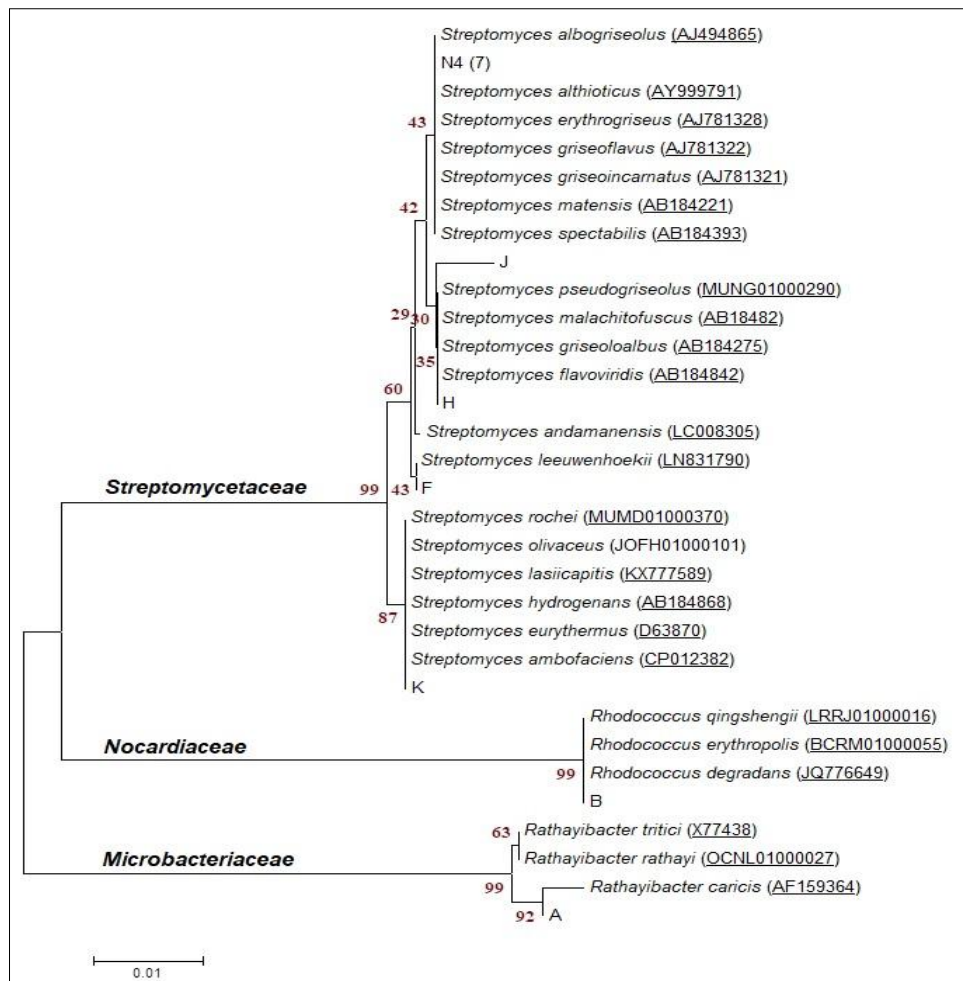
## 2- Identification moléculaire des isolats par séquençage du gène de l'ARNr 16S

La PCR a été réalisée sur l'ensemble des isolats obtenus à partir des trois sites étudiés soit vingt-neuf isolats. L'amplification était positive pour vingt-trois isolats et des fragments d'environ 635 pb ont été obtenus et séquencés. Tandis que pour les six isolats restants, l'amplification n'a pas pu être réalisée avec succès malgré plusieurs tentatives en changeant les paramètres et les conditions de la PCR. L'alignement BLAST nous a permis d'évaluer la diversité phylogénétique et la position taxonomique des isolats à l'aide du logiciel Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5) (Figure 16) (Tamura *et al.*, 2011). Les séquences d'ARNr 16S des vingt-trois isolats ont été téléchargées dans la base de données NCBI GenBank avec les numéros d'accès indiqués dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8 :** Identification moléculaire des isolats d'actinobactéries par séquençage du gène ARNr 16S.

Codes des isolats d'actinobactéries	Sources chaudes	Similarité des séquences les plus proches avec EzBioCloud (numéro d'accèsion)	Pourcentage de similarité	Numéros d'accèsion des isolats
A	Tleghma	<i>Rathayibacter tritici</i> (X77438)	99.68%	MK929471
B	Béniharoun	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (BCRM01000055)	99.69%	MK929472
C	Tleghma	<i>Streptomyces griseoflavus</i> (AJ781322)	99.84%	MK929473
C1	Tleghma	<i>Streptomyces griseoflavus</i> (AJ781322)	99.84%	MK929474
C3	Tleghma	<i>Streptomyces griseoflavus</i> (AJ781322)	99.69%	MK929476
C2	Tleghma	<i>Streptomyces olivaceus</i> (JOFH01000101)	99.83%	MK929475
K	Tleghma	<i>Streptomyces olivaceus</i> (JOFH01000101)	99.65%	MK908110
D	Tleghma	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (CP012382)	99.84%	MK929477
H1	Tleghma	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (CP012382)	99.84%	MK929480
L	Béniharoun	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (CP012382)	99.84%	MK929482
M	Béniharoun	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (CP012382)	99.84%	MK929483
E1	Khenchela	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (CP012382)	98.90%	MK929489
I	Tleghma	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (CP012382)	99.69%	MK929479
K1	Tleghma	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (CP012382)	100%	MK929481
F	Khenchela	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> (LN831790)	99.84%	MK929478
H	Tleghma	<i>Streptomyces flavoviridis</i> (AB184842)	99.69%	MK908107
J	Tleghma	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> (MUNG01000290)	99.21%	MK908108
N4	Tleghma	<i>Streptomyces griseoflavus</i> (AJ781322)	99.84%	MK908109
N5	Tleghma	<i>Streptomyces griseoflavus</i> (AJ781322)	99.84%	MK929484
N7	Tleghma	<i>Streptomyces griseoflavus</i> (AJ781322)	99.53%	MK929485
N8.3	Tleghma	<i>Streptomyces griseoflavus</i> (AJ781322)	99.36%	MK929486
N3	Tleghma	<i>Streptomyces griseoflavus</i> (AJ781322)	99.47%	MK929488
N9	Tleghma	<i>Streptomyces althioticus</i> (AY999791)	99.68%	MK929487

L'analyse a révélé que les vingt-trois isolats ont été attribués à trois genres d'Actinobacteria: *Streptomyces*, *Rhodococcus* et *Rathayibacter* (**Tableau 8**) avec des taux de similitude d'environ 99% et plus. Un seul isolat d'entre eux a atteint 100% de similitude. Les isolats appartiennent majoritairement au genre *Streptomyces* répertorié dans la base de données EzBioCloud (**Tableau 8**).



**Figure 16.** L'arbre phylogénétique est construit à l'aide du logiciel MEGA 5 (Tamura et al.,2011) selon la méthode des distances (Neighbor-Joining) (Saitou et Nei, 1987) montrant les relations phylogénétiques des séquences de gènes d'ARNr 16S amplifiées des isolats d'actinobactéries avec des séquences des souches types des espèces appartenant aux genres *Streptomyces*, *Rhodococcus* et *Rathayibacter* étroitement apparentées de la base de données EzBioCloud. Les séquences représentatives identifiées dans cette étude sont A, B, F, J, K et N4, suivies du nombre de clones avec des séquences nucléotidiques identiques. Les numéros d'accèsion EzBioCloud des séquences de référence sont indiqués entre parenthèses. Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les pourcentages du support bootstrap (1000 répliquats) (Felsenstein, 1985). La barre indique 0,01substitutions par position de nucléotide.Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980).

D'après les résultats, les *Streptomyces* représente le genre prédominant parmi toutes les souches isolées à partir des sources chaudes étudiées, avec un nombre de 21 sur les 23 isolats actinobactériens identifiés. La source chaude des Frères Chaouch (Tleghma, Mila) regroupe la majorité des isolats obtenus et présente plusieurs espèces appartenant au genre *Streptomyces*.

Le séquençage des fragments du gène de l'ARNr 16S obtenus par PCR nous a permis d'accéder à la diversité des actinobactéries cultivables présents dans les échantillons d'eau thermale étudiés. Nous soulignons au passage, que la grande majorité des résultats de l'identification moléculaire des isolats est en accord avec l'identification du genre par l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques réalisée dans ce travail. A cet effet, nous recommandons dans les études de la mise en évidence de la biodiversité des différents écosystèmes en actinobactérie, de ne pas négliger l'approche morphologique comme technique préliminaire simple et facile afin d'identifier les genres actinobactériens les plus connus.

Le séquençage du gène de l'ARNr 16S et l'analyse phylogénétique ont permis de classer tous les isolats en trois familles du phylum *Actinobacteria*: *Streptomycetaceae*, *Nocardiaceae* et *Microbacteriaceae*, représentées respectivement par les genres *Streptomyces*, *Rhodococcus* et *Rathayibacter*. Les résultats montrent que nos isolats sont répartis sur 9 espèces différentes (**Tableau 8**). Les isolats « C, C1, C3, N4, N5, N7, N8.3 et N3 » ont présenté une similitude de (99%) avec l'espèce *Streptomyces griseoflavus*. Les isolats « D, H1, L, M et I » ont montré la même similitude avec l'espèce *Streptomyces ambofaciens*. Tandis que les similitudes des isolats « E1 et K1 » avec cette espèce étaient de 98% et 100% respectivement. Les isolats « C2 et K » ont présenté une similarité de 99% avec l'espèce *Streptomyces olivaceus*. Les isolats « F, H, J et N9 » ont présenté une similitude de 99% respectivement avec les espèces *Streptomyces leeuwenkoekii*, *Streptomyces flavoviridis*, *Streptomyces pseudogriseolus* et *Streptomyces althioticus*. Les isolats « A et B » ont présenté une similitude de 99% avec respectivement les espèces *Rathayibacter tritici* et *Rhodococcus erythropolis*. Ces deux actinobactéries appartiennent aux genres rares.

D'après ces mêmes résultats, 91% des isolats sont affiliés au genre *Streptomyces*, 4% au genre *Rhodococcus* et 4% au genre *Rathayibacter*. Ces résultats estiment clairement une abondance importante du genre *Streptomyces* par rapport aux autres genres actinobactériens dans les écosystèmes hydriques étudiés. Ceci est parfaitement cohérent avec d'autres travaux similaires. Dans une étude de Lan Liu *et al.*, (2016) en Chine sur la biodiversité des actinobactéries cultivables dans certains sites géothermiques de Tengchong, 58 souches d'*Actinobacteria* ont été isolées, dont la majorité étaient affiliées à la genre *Streptomyces* (Liu

*et al.*, 2016). Les investigations de Chitti Thawai (2012) en Thaïlande, basées sur la même technique culturale, ont montré que 32 actinobactéries ont été isolées à partir de sédiments de sources chaudes. L'identification de ces bactéries a révélé que 18 étaient des *Streptomyces* (Thawai, 2012). Ce constat nous permet d'avancer que le genre *Streptomyces* est comme dans les écosystèmes telluriques, le genre le plus dominant dans les sources chaudes. Dans ce contexte, une question de l'origine tellurique de ces *Streptomyces* s'impose. Des études complémentaires orientées dans ce sens, peuvent être d'une très grande valeur scientifique et peuvent contribuer à la compréhension du système écologique qui gère cet écosystème extrême, où les conditions géophysiques jouent un rôle primordial dans le développement de la vie d'une espèce.

Dans les travaux qui s'intéressent à la mise en évidence de la biodiversité des actinobactéries par les techniques culturales, les *Streptomyces* constituent la communauté la plus majoritaire. Paradoxalement, les mêmes études par approches moléculaires comme la métagénomique par exemple, ce genre bactérien semble être absent et ce sont d'autres genres qui apparaissent. En effet, dans une étude menée sur quatre sources chaudes en Chine, en Russie et aux États-Unis, 346 clones d'actinobactéries ont été mis en évidence. Ils ont été assignés au sous-ordre *Frankineae*, *Uncultured Actinobacteria* et *Uncultured Candidatus Microthrix* (Song *et al.*, 2009), les *Streptomyces* sont absents. Dans une autre étude réalisée sur quatre sites géographiquement distincts en Zambie, en Chine, en Nouvelle-Zélande et au Kenya, une grande diversité phylogénétique d'OTU actinobactériennes a été révélée. Dans ces échantillons, la majorité des séquences appartenaient à des *Uncultured* taxons. Quatre des 28 OTU présentaient 79% d'homologies avec *Mycobacterium*, *Glycomyces*, *Aeromicobacterium* et *Couchiplane* (Valverde *et al.*, 2012). Selon certains chercheurs, les méthodes moléculaires sont plus adaptées pour étudier la diversité microbienne dans ces écosystèmes (Øvreås et Torsvik, 1998; Yang *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2013). Plusieurs études ont montré que l'approche métagénomique a révélé la diversité cachée de ces écosystèmes naturels (López-López *et al.*, 2013), dévoilant la proportion de microorganismes non-cultivables (Dauga *et al.*, 2005). Contrairement à cela, d'autres études employant des approches moléculaires ont totalement échouées dans l'isolement des microorganismes nouveaux à partir des échantillons environnementaux (Alain *et al.*, 2004; Gonzalez-Toril *et al.*, 2003). Ces techniques ont également montré certaines limites dans la détection d'espèces rares dans une communauté microbienne (López-López *et al.*, 2013). Il est bien connu que les facteurs biogéographiques et environnementaux influencent directement la diversité des microorganismes dans différents écosystèmes (Martiny *et al.*, 2006; Ramette et Tiedje, 2007; Song *et al.*, 2009; Valverde *et al.*,

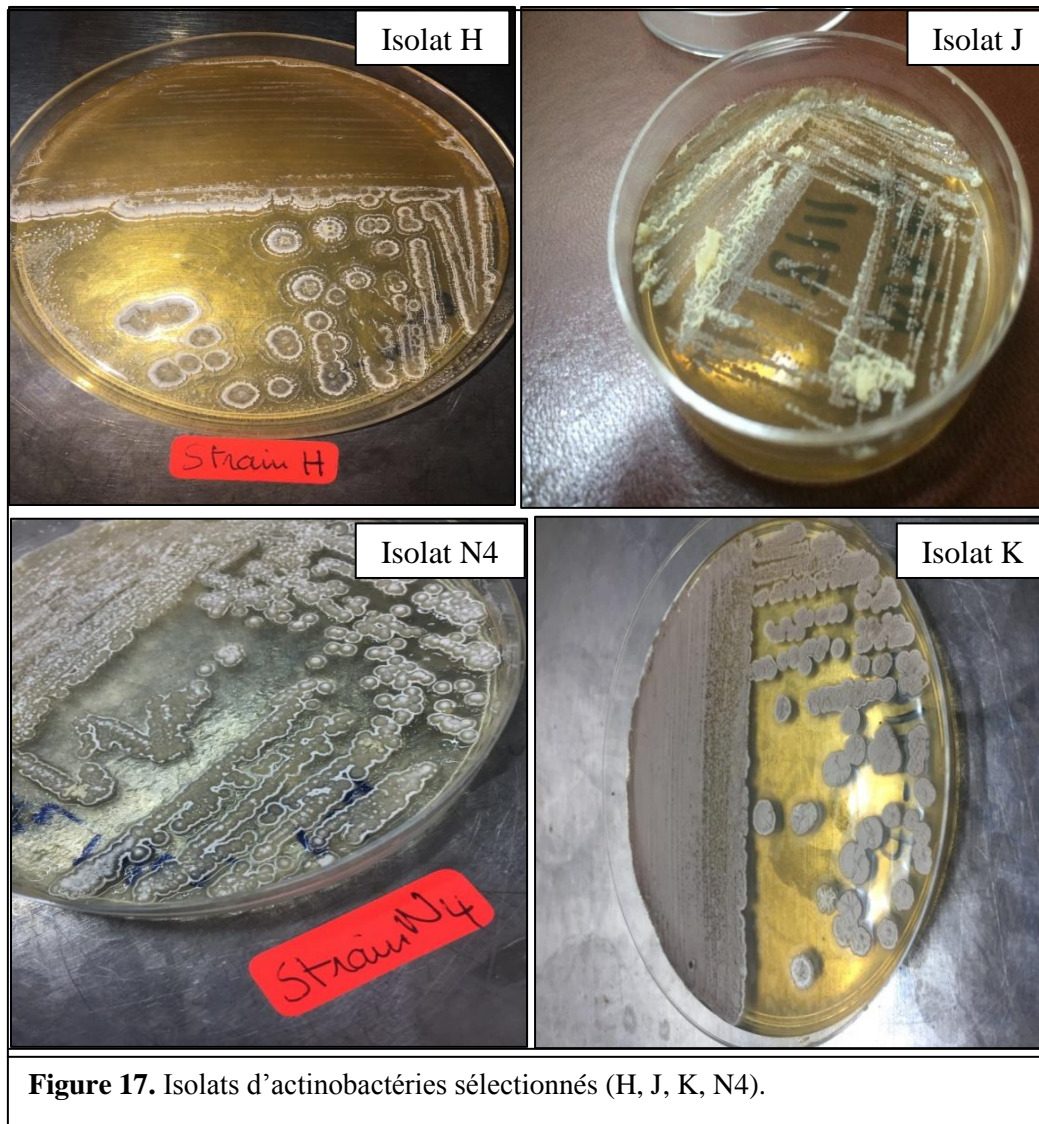
2012). Des études consacrées à la communauté des actinobactéries montrent clairement que le pH et surtout la température sont les facteurs les plus importants contrôlant la communauté microbienne (Valverde *et al.*, 2012; López-López *et al.*, 2013).

Les approches de cultures conventionnelles impliquent une sélection de microorganismes cultivés. Cela conduit d'après nous, à l'obtention d'une image restreinte de la diversité microbienne d'un écosystème. Le succès de l'isolement dépend principalement des stratégies des techniques et des milieux d'isolement utilisés. Ces éléments importants nécessitent dans les investigations de la diversité microbienne, l'emploi de plusieurs stratégies, techniques et milieux, afin de toucher le plus grand nombre de la population microbienne. Les chercheurs ont fait des efforts considérables et laborieux pour optimiser ces techniques culturelles (Alain et Querellou, 2009). Cependant, malgré ces efforts, certains genres bactériens extrêmement rares ou exigeants restent incapables de se développer *in vitro*, en utilisant des milieux de culture conventionnels (Dauga *et al.*, 2005).

Il en ressort clairement qu'aucune des approches culturelles ou moléculaires n'est suffisante à elle seule pour déterminer la totalité de la communauté microbienne d'un échantillon. D'après nous il est donc nécessaire d'employer une panoplie de techniques différentes afin d'explorer correctement des sites et des échantillons d'eau thermale qui peut nous révéler un monde microbien et surtout des actinobactéries totalement inconnus.

### 3- Caractérisation des isolats sélectionnés

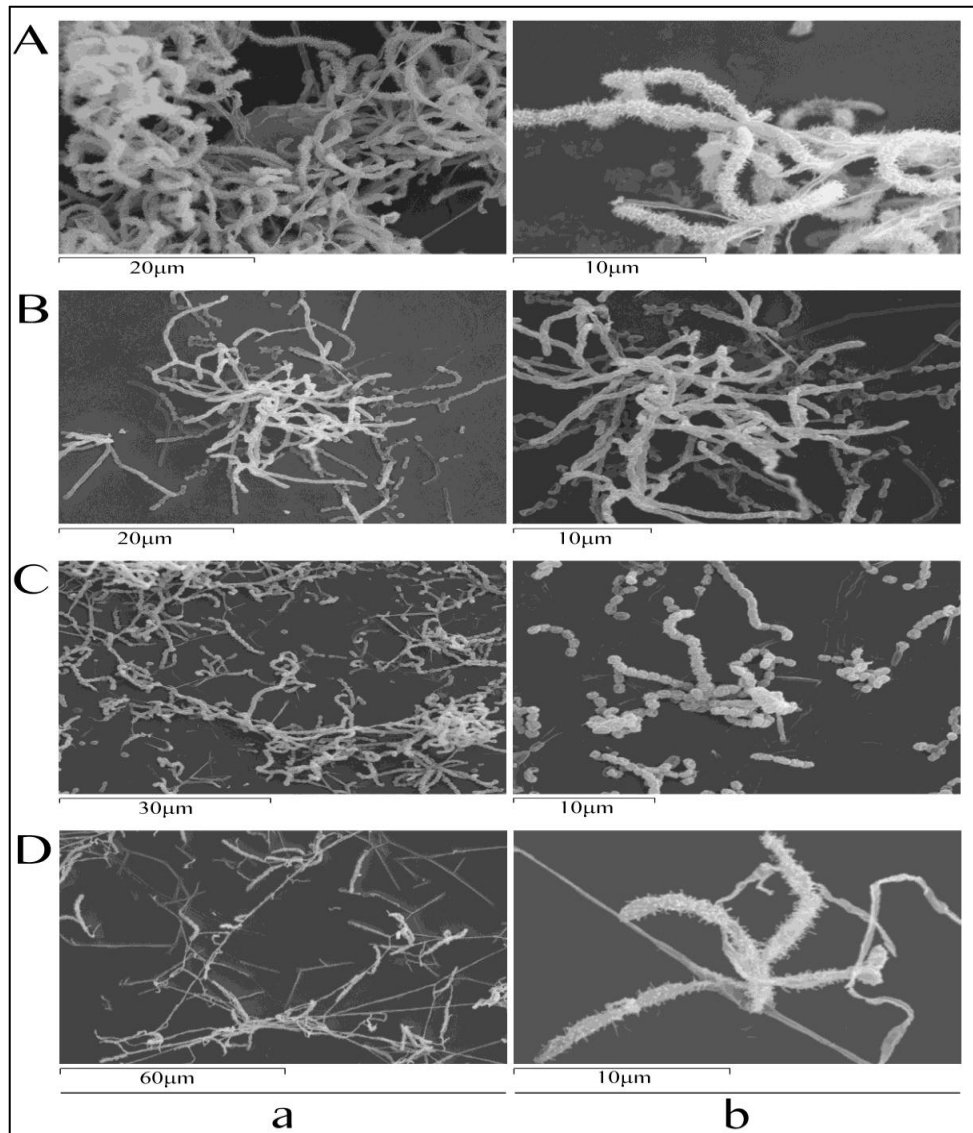
Par manque de moyen, nous avons sélectionné pour une étude plus approfondie 4 isolats nommés H, J, K et N4 (**Figure 17**). Le reste fera l'objet des travaux avenir. Ces 4 souches ont été assignées respectivement à *Streptomyces flavoviridis*, *Streptomyces pseudogriseolus*, *Streptomyces olivaceus* et *Streptomyces griseoflavus* (**Tableau 8**). Nous attirons l'attention que ces souches ont été pour la première fois décrites et isolées à partir des sources chaudes.



### 3-1 Observation des souches en microscopie électronique

La microscopie électronique à balayage (MEB) a révélé des variations morphologiques des chaînes de spores et également des spores produites entre les quatre isolats sélectionnés. Les chaînes de spores présentent des formes de type Rectiflexible ou Verticillati, composées de spores velues, lisses ou épineuses (**Figure 18**).





**Figure 18.** Microscopie électronique à balayage (MEB) des 4isolats d'actinobactéries sélectionnés. **(A)** Isolat H : chaînes de spores de type Retinaculiaperti avec des spores poilues en forme de bâtonnet. Barres, 20µm (a) et 10µm (b). **(B)** Isolat K : chaînes de spores de type rectiflexible avec des spores globuleuses lisses. Barres, 20µm (a) et 10µm (b). **(C)** Isolat N4 : chaînes de spores de type Retinaculiaperti simples avec des spores globuleuses épineuses. Barres, 30µm (a) et 10µm (b). **(D)** Isolat J: chaînes de spores verticillées avec des spores velues. Barres, 60µm (a) et 10µm (b).

L'isolat H assigné à l'espèce *S. flavoviridis* est caractérisé par une morphologie en chaînes de spores longues droites ou lâchement enroulées (type Verticillati) avec des spores de forme de bacilles portant des poils courts (**Figure 18A**). Cet aspect morphologique des spores correspond parfaitement à la caractérisation des aspects sporales décrite par Dietz Alma et Mathews John, 1977.

L'isolat J assigné à l'espèce *S. pseudogriseolus* est caractérisé par une morphologie en chaînes des spores en forme de bacilles, droites ou relâchée (type Rectiflexibles) avec des

spores épineuses (**Figure 18 D**). L'aspect de ce type de spores ressemble à cette espèce décrite dans les travaux de Tresner *et al.*, 1961.

L'isolat K identifié comme étant l'espèce *S.olivaceus* est caractérisée par de longues chaînes de spores en forme de cocci, droites (type Rectiflexibles), présentant des protubérances obtuses et une surface lisse (**Figure 18 B**). D'après les mêmes travaux de Tresner *et al.*, 1961, plusieurs membres du genre *Streptomyces* à spore lisse notamment cette souche, sont semblables à cette espèce.

L'isolat N4 assigné à *S. griseoflavus* est caractérisé par des spores en forme de cocci épineuses formant de longues chaînes droites recourbées ou parfois enroulées (Verticillati type) (**Figure 18 C**). Cette espèce fait partie du groupe des *Streptomyces* à spore épineuses regroupe (Tresner *et al.*, 1961).

Les aspects morphologiques des spores de ces 4 souches sont en parfaite adéquation avec l'identification moléculaire. Cette technique d'identification avait joué au-paravent un rôle majeur dans la distinction des *Streptomyces* des autres actinobactéries à spores et dans la caractérisation des espèces du genre *Streptomyces*. En outre, le cycle de vie des streptomycètes à savoir l'aspect des mycélium végétatif et aérien offre des informations pour la caractérisation morphologique des *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1983; Anderson et Wellington, 2001). Ces deux caractérisations morphologiques qui reposaient essentiellement sur la microscopie optique et la microscopie électronique à balayage, ont longtemps aidé les taxonomistes dans l'identification des *Streptomyces* (Li *et al.*, 2016) et de certains genres d'actinobactéries (Williams *et al.*, 1989). Ces mêmes caractéristiques, sont encore utilisées dans la taxonomie moderne des *Streptomyces* (Castillo *et al.*, 2006; Dastager *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011).

### 3-2 Caractérisation physiologique

L'étude des paramètres physiologique les plus importants a permis d'évaluer les capacités des isolats sélectionnés à se développer à différentes températures, à différents pH et à différentes concentrations de NaCl. L'action de certains antibiotiques et du lysozyme ont été également testés. Les résultats sont réunis dans le (**Tableau 9**).

**Tableau 9:** Caractéristiques physiologique des isolats H, J, K et N4

	<b>Isolats actinobactériens sélectionnés</b>			
	<b>H</b>	<b>J</b>	<b>K</b>	<b>N4</b>
<b>Nacl</b>	(DO)			
0%	1,910	2,744	0,167	3,28
1%	4,940	6,620	0,178	2,910
4%	2,880	1,869	4,160	1,448
7%	2,305	1,333	1,680	0,700
10%	0	0,993	2,120	3,050
15%	0	0,053	0,014	0
20%	0	0	0,045	0
<b>Lysozymes</b>	(DO)			
Témoin	0,357	1,776	0,773	6,750
lysozymes (300U/ml)	0,441	0,249	2,924	1,634
<b>La survie à 50°C</b>	(DO)			
Témoin (30°C)	0,4	2,7	1,2	8
Croissance à 50°C	1,4	12	1,4	5
<b>Températures</b>				
4°C	-	-	-	-
14°C	+	+	+	+
30°C	+++	+++	++	+++
37°C	+++	+++	+++	+++
<b>pH</b>				
4,3	-	-	-	-
7,3	+++	+++	+++	+++
10,3	+/-	+++	+++	+++
<b>Antibiotiques</b>				
Antimicine	-	++	+++	+++
Ampecilline	-	-	-	++
Chloramphénicole	-	-	-	-
Kanamycine	-	-	-	-
Tétracycline	-	-	-	-

(-) absence de croissance; (+/-) très faible croissance; (+) croissance modérée; (++) bonne croissance; (+++) sporulation ; (DO) densité optique.

Les résultats montrent que l'ensemble des isolats sélectionnés ont une croissance optimale à 30 et à 37°C et une faible croissance à 14°C. Cependant, aucune croissance n'a été observée dans les conditions expérimentales choisies à la température de (4°C) (**Tableau 9**). Le test de survie à 50°C a montré que les isolats H, J, et K avaient une DO élevée à 50°C. Ce résultat est jugé positif comparativement au témoin (à 30°C). Nous notons ici la forte tolérance de l'isolat J qui présente un taux important de croissance à cette température élevée. Contrairement à cela l'isolat N4, montre une faible croissance à la température de 50°C

comparativement au témoin (à 30°C) (**Tableau 9, Figure 20**). Selon la classification de Singh *et al.*, 2013, nos isolats sont des actinobactéries thermophiles facultatives (Singh *et al.*, 2013).

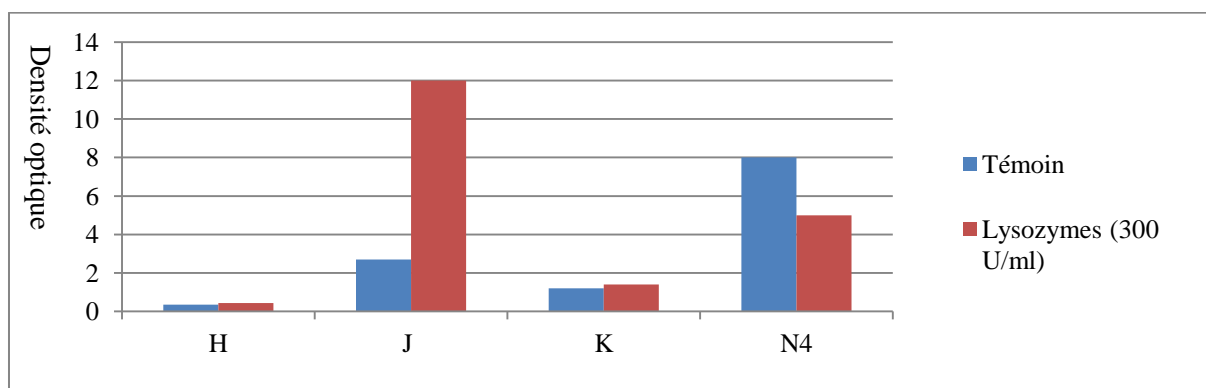
Les isolats sélectionnés se développent et sporulent à des pH de 7,3 et de 10,3 à l'exception de l'isolat H, qui présente une faible croissance à pH 10,3. Cependant, la croissance de tous les isolats est inhibée à pH 4,3 (**Tableau 9**). Il est bien connu que les actinobactéries préfèrent un pH neutre à alcalin pour leurs croissance. Nos résultats ont montré clairement que les actinobactéries isolés des eaux thermales, préfèrent également un pH alcalin.

Cette étude a également montré que les isolats H et J tolèrent une concentration de 7% de NaCl. Les isolats K et N4 tolèrent une concentration d'NaCl plus importante (10%). Cependant, tous les isolats sont inhibés par 15 et 20% de NaCl (**Figure 21**). La croissance en présence de chlorure de sodium est un outil utile pour différencier les espèces d'actinobactéries. Selon la classification de Kushner (1978), les isolats testés sont considérés comme étant des actinobactéries halotolérantes. Ce sont donc des bactéries qui tolèrent jusqu'à 10% de NaCl qui n'est pas obligatoire pour leur croissance.

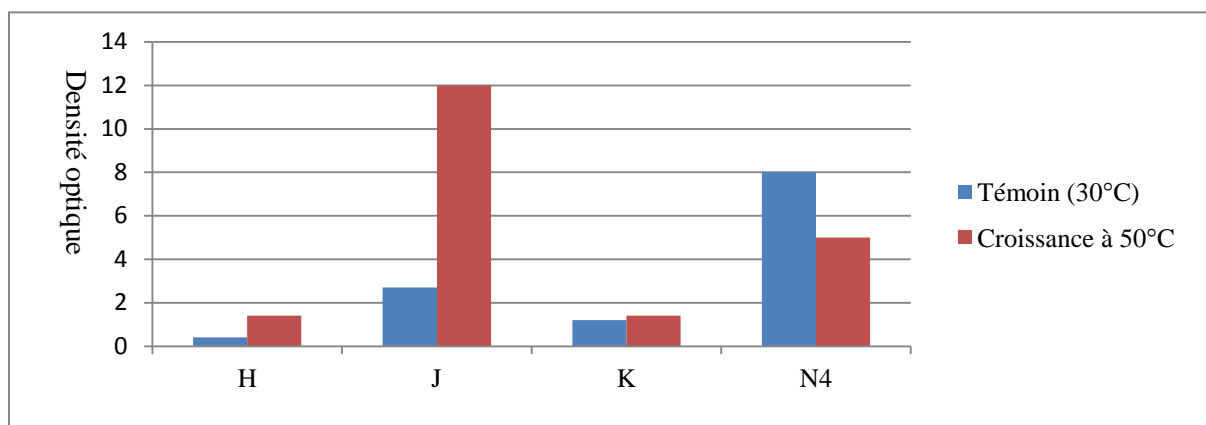
La résistance des isolats aux lysozymes est représentée dans le **Tableau 9**. L'ensemble des isolats ont résisté aux lysozymes différemment (**Figure 19**). Les isolats H, K et N4 ont résistés à l'action des lysozymes. Tandis que l'isolat J s'est montré sensible. La résistance au lysozyme a été adoptée comme critère de description taxonomique des actinobactéries (Kutzner, 1981). L'action du lysozyme agit principalement sur la paroi cellulaire des organismes sensibles. Les *Streptomyces* sont en général sensible à l'action des lysozymes excepté quelques espèces. Cette sensibilité est due à la composition de leurs parois cellulaires en glucides de type hexosamine. En revanche, les parois cellulaires du genre *Nocardia* résistent au lysozyme car elles ne contiennent que de très petites quantités d'hexosamine et les principaux constituants glucidiques sont l'arabinose et le galactose. Ces différences dans la composition des glucides peuvent expliquer dans une certaine mesure la différence de sensibilité à l'action du lysozyme, puisque cette enzyme est censée attaquer certaines liaisons glucidiques contenant des sucres aminés (Meyer *et al.*, 1936; Epstein et Chain, 1940; Sohler *et al.*, 1958).

Le test de l'action des antibiotiques montre que les isolats (J, K et N4) sont résistants à l'antimicine et que l'isolat N4 est résistant à l'ampicilline. Le reste des isolats sont inhibés par les autres antibiotiques testés (**Tableau 9**). Selon Marcone *et al.*, 2010, la résistance des isolats à certains antibiotiques est expliquée par la présence de gènes de résistances, dans leur patrimoine génétique. Ces gènes de résistance en plus ceux de la biosynthèse des

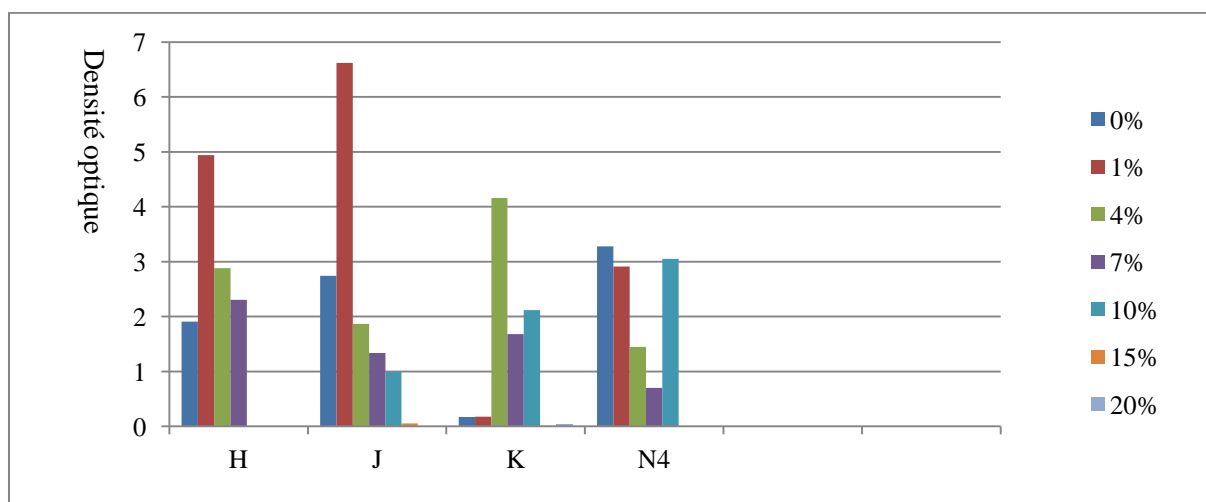
antibiotiques, sont situés dans le même « groupe » et sont transcrits simultanément, ce qui assure la protection du microorganisme producteur (Martin, 1992). Le profil antibiotique est un autre outil indispensable, utilisé récemment dans la taxonomie polyphasique bactérienne.



**Figure 19.** Croissance des isolats sélectionnés en présence des lysozymes.



**Figure 20.** Croissances des isolats sélectionnés à 50°C.



**Figure 21.** Croissance des isolats en présence de différentes concentrations de NaCl.

La caractérisation physiologique des isolats est importante pour déterminer certaines espèces d'actinobactéries (Bergey's Manual, 2012). Cependant cette étude reste insuffisante pour déterminer toutes les espèces des genres actinobactériens. Le rôle de la taxonomie numérique et ces applications statistiques est d'une importance capitale (Sneath, 1989). En outre, l'ensemble des tests physiologiques s'avère intéressant par le fait qu'ils indiquent certaines aptitudes physiologiques importantes, pouvant être utiles pour des applications biotechnologiques et dans la recherche et le criblage des isolats performants.

### 3-3 Caractérisation métabolique

Les résultats de l'étude des caractéristiques métaboliques des isolats provenant des sources thermales étudiées sont rapportés dans le (Annexe 2). Les 23 isolats sont physiologiquement différents entre eux pour certains caractères physiologiques alors qu'ils partagent plusieurs caractères métaboliques. Il s'agit principalement de l'utilisation du ribose, la production de l'estérase, de l'estérase-lipase, de la leucine-arylamidase, de l'Alanyl-Phenylalanyl-Proline-Arylamidase et de la Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase. Les isolats partagent aussi l'incapacité d'utiliser le glycogène, l' $\alpha$ -frucosidase et la production de l'acétone.

Les galeries d'identification des actinobactéries sont limitées. BioMérieux propose deux seulement pour la description de routine des actinobactéries. Ce sont les apiCoryne, destiné en particulier pour les *Propionibacterineae*, *Micrococcineae* et *Corynebacterinae* (MacFaddin, 1980) et L'api Zym, pour la détection d'enzymes bactériennes (Humble *et al.* 1977) qui a été utilisé avec succès pour l'identification des *Actinomycetaceae* (Kilian, 1978).

Les galeries api Coryn et Rapid ID 32 STREP ont révélé dans notre étude, que plus de 50% des isolats utilisent le sorbitol, le tréhalose, le raffinose, le pullulane, le maltose, la mélézitose, le glucose et le xylose. Cependant moins de 50% des isolats utilisent, le lactose, le saccharose, la cyclodextrine, le mélibiose, la D-arabitol et le tagatose. Un nombre moins important d'isolat soit 13%, utilisent le mannitol et le L-arabinose.

La galerie API-ZYM, rapporte le profil enzymatique de 23 isolats obtenus. Au total, 31 activités enzymatiques ont été testées. Les résultats montrent une diversité enzymatique intéressante et très diversifiée. Nos isolats sont capables de produire plusieurs enzymes attractives et importantes d'un point de vue biotechnologique. L'alcaline phosphatase et la catalase sont produites par tout les isolats sauf l'isolat A assigné au genre *Rathayibacter*.

L'acide phosphatase est synthétisée par tous les isolats sauf l'isolat K1. La capacité de l'hydrolyse de la gélatine est assurée par l'ensemble des isolats, à l'exception de l'isolat B assigné au genre *Rhodococcus*. De même, la valine-arylamidase est synthétisée par tous les isolats excepté l'isolat C3. La majorité des isolats sont capables de produire la  $\alpha$ -glucosidase, la lipase et la  $\beta$ -galactosidase avec respectivement un pourcentage de 87%, 83% et 65%. La N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase ( $\beta$ -NAG) et la  $\alpha$ -chemotrypsine est détectée chez respectivement 83 % et 52% des isolats affiliés au genre *Streptomyces*. En outre, 70% des isolats affiliés au genre *Streptomyces*, sont capables de réduire les nitrates. L'uréase est produite par 78% des isolats appartenant aux genres *Streptomyces* et *Rhodococcus*.

Cependant, une minorité est positive pour l'acide-arylamidase, la  $\beta$ -glucosidase et la pyrazinamidase avec un pourcentage de 48%. Ces genres actinobactériens appartiennent aux genres *Rathayibacter*, *Rhodococcus* et *Streptomyces*. Alors que, le même pourcentage des isolats affiliés aux genres *Rhodococcus* et *Streptomyces*, sont capables de produire la glycyl-tryptophane-arylamidase (GTA). Les isolats appartenant au genre *Streptomyces* sont capables de synthétiser la  $\alpha$ -mannosidase, l'arginine dihydrolase, l' $\alpha$ -galactosidase et la  $\beta$ -mannosidase. D'autres isolats sont capables d'hydrolyser la hippurate. La pyroglutamic-acide-arylamidase est produite par 9% des isolats affiliés aux genres *Rhodococcus* et *Streptomyces*. L'isolat J assigné au genre *Streptomyces* est l'unique isolat possédant la trypsine, la  $\beta$ -glucuronidase et la pyroglutamic-arylamidase.

Concernant les 4 isolats sélectionnés, ils ont la capacité d'utiliser plusieurs sucres comme le ribose, le tréhalose et la xylose. Ils sont capables de produire une variété très importante d'enzymes, comme l'alkaline phosphatase, l'estérase, l'estérase-lipase, la lipase, la leucine-arylamidase, la valine-arylamidase, la cystine-arylamidase, l'acide-phosphatase, la Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, la  $\alpha$ -glucosidase, l'Alanyl-Phenylalanyl-Proline-Arylamidase, l'hydrolyse de la gélatine et la catalase. D'une manière plus synthétique, l'isolat H s'est révélé positif pour 14 activités enzymatiques, l'isolat J détient 24 activités enzymatiques, l'isolat K est positif pour 21 activités et l'isolat N4 possède 18 activités enzymatiques différentes (Annexe 2). Ce résultat est en parfaite adéquation avec ceux de plusieurs chercheurs qui stipulent que les *Streptomyces* ont ces mêmes activités enzymatiques (Khan *et al.*, 2010; Sakiyama *et al.*, 2014 ; Charousová *et al.*, 2019).

Selon nos résultats, les isolats affiliés au genre *Streptomyces* présentaient une diversité enzymatique très importante, comparativement aux autres genres isolés à partir des eaux

thermales étudiées. Ces résultats ressemblent à ceux de Vitezová (2013). Les *Streptomyces* thermophiles sont considérés maintenant comme une source inépuisable d'enzymes. D'ailleurs, ils ont été utilisés pour la production de l'isomérase, de l'amylase, de la cellulase, de la lipase, de la protéase, de la pectinase, de la kératinase, de l'asparginase, de la chitinase et de la xylanase et de plusieurs autres enzymes d'intérêt biotechnologique et biomédical. Ces enzymes dominent le marché industriel des détergents, des textiles, des pâtes et papiers, de la synthèse organique, des biocarburants ainsi que le domaine des tests de diagnostic clinique (Shivlata *et al.*, 2015).

La caractérisation métabolique montre que certains de nos isolats présentaient des profils biochimiques différents des espèces types identifiées. En effet, les isolats C, C1, C3, N4, N5, N7, N8.3 et N3 assignés moléculairement à la même espèce *S. griseoflavus*, présentaient des caractères métaboliques différents. C'est le cas aussi des isolats D, H1, L, M, E1, I et K1 assignés tous à *S. ambofaciens*, ainsi que pour les isolats C2 et K identifiés à *S. olivaceus*. Ce constat prouve que ces représentants bactériens sont des souches (biovars) différents.

### **3-4 Caractérisation chimiotaxonomique des parois cellulaires bactérienne**

#### **3-4-1 Analyse de l'acide diaminopimélique (DAP)**

Les analyses montrent que la paroi cellulaire des isolats H, J, K et N4 contenait du LL-DAP et absence de sucres caractéristiques (**Tableau 10, Figure 22**).

#### **3-4-2 Profil des sucres**

L'analyse montre que la xylose se trouve dans les hydrolysats des quatre isolats. Le galactose, le glucose et le mannose sont présents dans tous les isolats excepté l'isolat K. Le ribose est présent dans les isolats N4 et H. Cependant, l'arabinose et le rhamnose sont absents chez tous les isolats (**Tableau 10, Figure 23**).

#### **3-4-3 Profil phospholipidique**

Selon le profil phospholipidique les parois cellulaires des isolats testés contiennent principalement de la phosphatidyléthanolamine (PE) et du diphosphatidylglycérol (DPG) (**Tableau 10, Figure 24**).

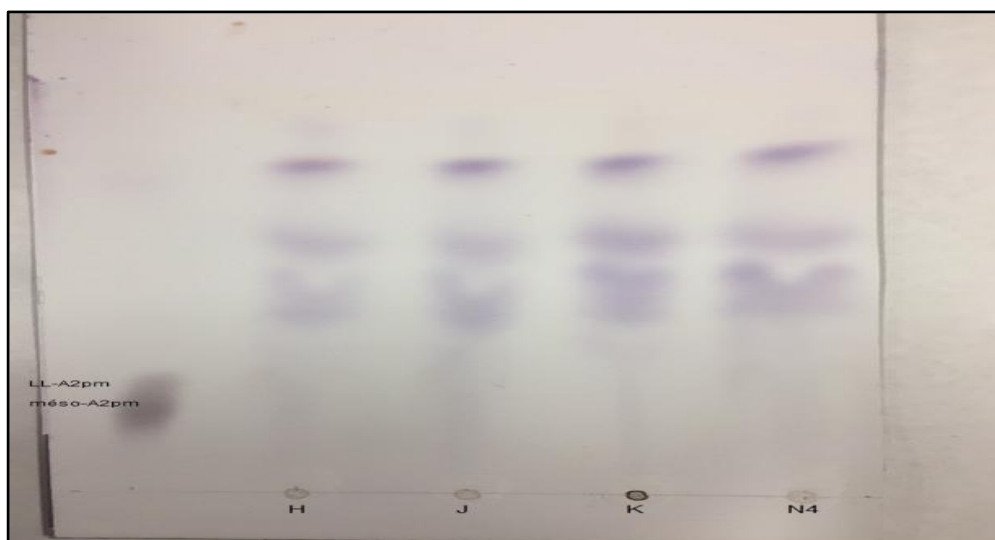


### 3-4-4 Analyse des ménaquinones

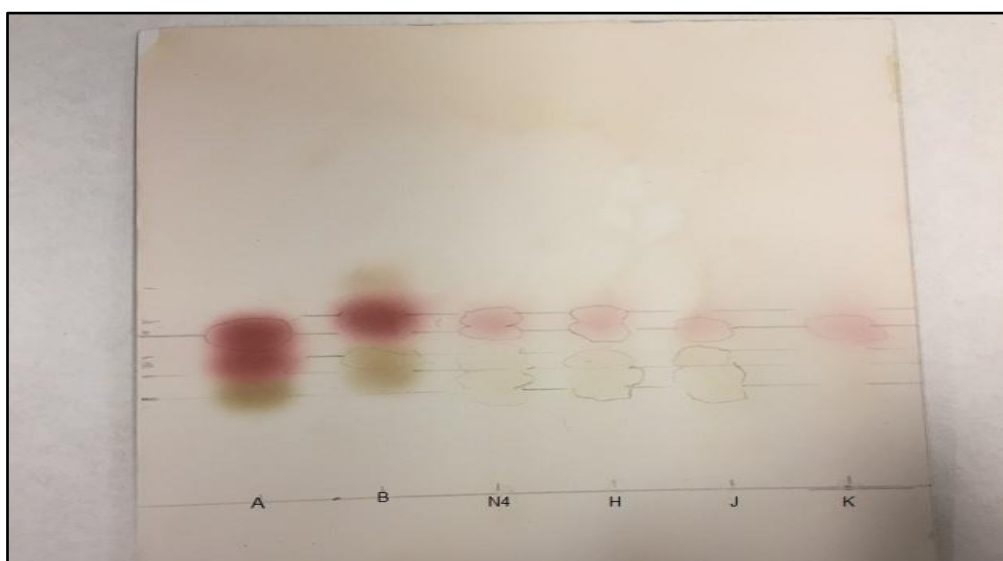
Les ménaquinones détectées en quantités importantes sont les ménaquinones hexa- et octahydrogénées avec neuf unités isoprène. Ce sont des MK-9 (H6) et MK-9 (H8) (**Tableau 10**).

### 3-4-5 Analyse des acides gras

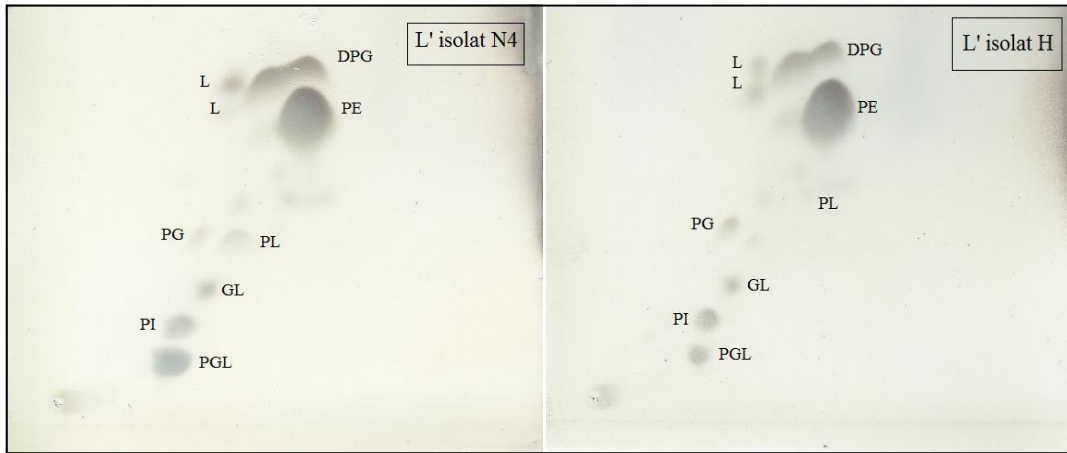
L'analyse des acides gras a montré que les isolats contiennent une forte proportion (>5%) de Anteiso-15:0, Iso-15:0, Iso-16:0, Anteiso-17:0 et Iso-17:0 (**Tableau 10**).



**Figure 22.** Séparation des isomères DL-DAP des hydrolysats des isolats sélectionnés par chromatographie sur couche mince.



**Figure 23.** Séparation des sucres des cellules entières des hydrolysats des isolats sélectionnés par chromatographie sur couche mince. A : solution standard 1 (galactose, arabinose et xylose) B : solution standard 2 (rhamnose, mannose, glucose et ribose).



**Figure 24.** Séparation des lipides polaire des hydrolysats des isolats actinobactéries H et N4 par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice.

**Tableau 10 :** Etude chimiotaxonomique des isolats sélectionnés.

	<b>H</b>	<b>J</b>	<b>K</b>	<b>N4</b>
<b>DAP</b>				
LL-DAP	LL	LL	LL	LL
Sucres caractéristiques	-	-	-	-
<b>Sucres</b>				
Galactose	+	+	-	+
Arabinose	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+
Glucose	+	+	-	+
Mannose	+	+	-	+
Ribose	+	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	-
<b>Principaux acides gras (&gt;5%)</b>				
Anteiso-C <sub>15:0</sub>	<b>15,71</b>	<b>14,60</b>	<b>13,23</b>	<b>12,26</b>
Iso-C <sub>15:0</sub>	3,80	4,90	<b>12,90</b>	<b>12,67</b>
Iso-C <sub>16:0</sub>	<b>23,50</b>	<b>24,40</b>	<b>27,28</b>	<b>28,36</b>
Anteiso-C <sub>17:0</sub>	<b>15,46</b>	<b>15,50</b>	<b>10,20</b>	<b>10,31</b>
Iso-C <sub>17:0</sub>	3,36	4,40	<b>7,10</b>	<b>6,76</b>
<b>Principaux ménaquinones</b>				
MK8	6%	5%	6%	7%
Mk8(H2)	2%	2%	2%	4%
MK9(H2)	2%	Traces	2%	Traces
MK9(H4)	11%	7%	10%	6%
MK9(H6)	38%	30%	36%	35%
MK9(H8)	15%	15%	20%	26%
<b>Phospholipides</b>				
DPG (diphosphatidylglycerol)	+	+	+	+
L (lipide)	+	+	+	+
PE (phosphatidylethanolamin)	++	++	++	++
PL (phospholipide)	Traces	+	Traces	Traces
PG (phosphatidylglycerol)	+	Traces	Traces	Traces

GL (glycolipide)	+	+	+	+
PI (phosphatidylinositol)	+	+	+	+
PGL (phosphoglycolipide)	+	+	+	+

Les isolats sélectionnés présentent des caractéristiques chimiotaxonomiques qui soutiennent leur affiliation au genre *Streptomyces*. La paroi cellulaire contient de l'acide LL-diaminopimélique et ne possède pas de sucres caractéristiques, indiquant ainsi avoir une paroi cellulaire de type I (Lechevalier et Lechevalier, 1970). La xylose, le galactose, le glucose, le mannose et le ribose sont présents dans les hydrolysats de toutes les cellules. La détection des ménaquinones MK-9 (H6) et MK-9 (H8) est en bon accord avec les rapports des profils desménaquinones similaires appartenant à plusieurs espèces du genre *Streptomyces* (Alderson *et al.*, 1985). Le profil des phospholipide est de type PII (Lechevalier *et al.*, 1977), contenant principalement la phosphatidyléthanolamine (PE) comme phospholipide caractéristique.

Finalement, les acides gras cellulaires caractéristiques sont les Anteiso-C15:0, les Iso-C15:0, les Iso-C16:0, les Anteiso-C17:0 et les Iso-C17:0, ce qui soutient l'affiliation des isolats au genre *Streptomyces* (Kroppenstedt, 1985).

Les caractéristiques morphologiques et chimiotaxonomiques des isolats sélectionnés, et la séquence de leur gène ARNr 16S, sont exactement similaires avec les caractéristiques des membres du genre *Streptomyces*.

### 3-5 Détermination du G+C %

Les résultats de l'analyse estimant le G+C% contenu dans le génome des isolats sélectionnés H, J, K et N4 sont présentés dans le **Tableau 11**. Les pourcentages de G+C des isolats fluctuent dans l'intervalle de 41 à 66%.

**Tableau 11 :** Valeurs des températures de fusion et de la teneur en G+C de l'ADN génomique des quatre souches sélectionnées.

Isolats	G + C mol% * / écart type
H	56,77 ± 0,13
J	41,46 ± 0,44
K	66,13 ± 0,46
N4	59,24 ± 1,48
<i>E.coli DH10B</i>	48,02 ± 0,26

\*Le% G + C a été obtenu en appliquant l'équation:  $G + C\% = Tm - 64,9 / 0,41$  (les valeurs Tm ont été obtenues à partir des courbes de fusion).

<http://www.biology.arizona.edu/biomath/tutorials/Linear/LinearFunctionApplication/DNAmet.html>

Les actinobactéries sont définies par un coefficient de Chargaff (GC%) élevé compris entre 60-70% (Ventura *et al.*, 2007, Prescott *et al.*, 2010). A l'exception des isolats K et N4, les deux autres présentent des valeurs de GC% relativement faibles par rapport aux valeurs habituelles décrites dans la littérature. Les rares rapports qui signalent un faible G+C% des actinobactéries concernent des espèces pathogènes du genre *Gardnerella* (Ghai *et al.*, 2012). En outre, dans un travail qui repose sur une approche métagénomique, un nouveau groupe des actinobactéries d'origine hydrique à faible GC ont été détectées. Il s'agit des actinobactéries aquatiques à faible GC (mol% GC de l'ADN génomique). Ce sont tous des actinobactéries qui présentent des pourcentages de G-C entre 40 et 50%. (Ghai *et al.*, 2011 ;Ghai *et al.*, 2012). Ces mêmes résultats, sont également trouvés dans une étude menée sur les eaux douce, où, le G+C est de 42% seulement (Ghai *et al.*, 2011; Ghai *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2012).

D'ailleurs, deux génomes d'actinobactéries à faible G+C% sont désormais disponibles, dans les banques internationales. Le premier provient d'un lac situé à Wisconsin, aux États-Unis avec une teneur en GC de 42% (Garcia *et al.*, 2012). L'autre a été isolé par une approche culturelle avec un G+C% de 51,7(Kang *et al.*, 2012).

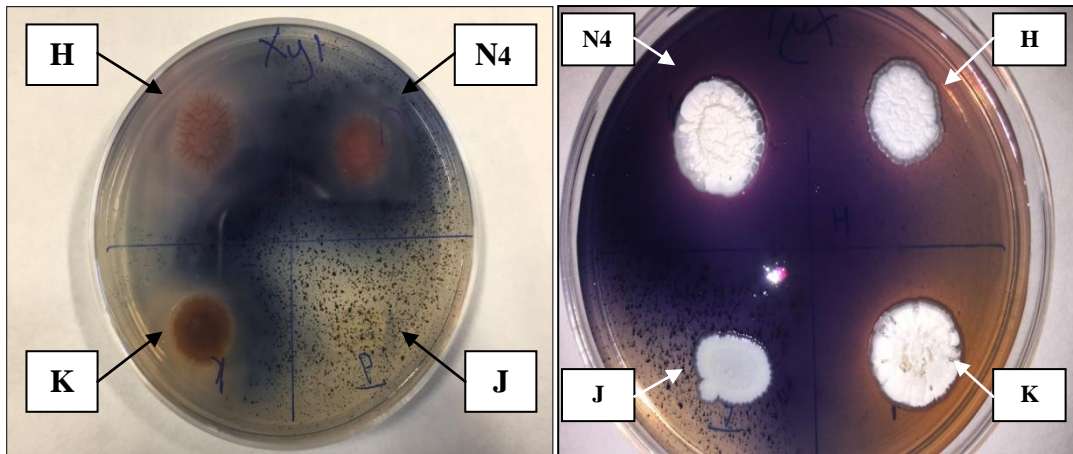
Selon nos connaissances, c'est pour la première fois que ce résultat est décrit. Ils montrent clairement que les actinobactéries isolés à partir des eaux thermales ont un G+C% faible contrairement à ceux isolés du sol. Ces conclusions novatrices, ouvrent une voie d'investigation dans ce domaine et méritent d'après nous, d'autres recherches.

### 3-6 Criblage de l'activité enzymatique

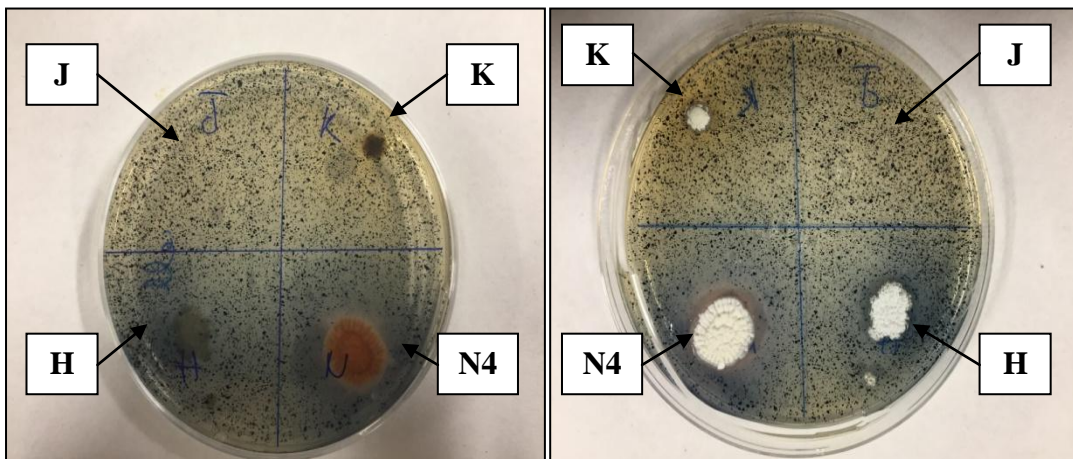
Le criblage enzymatique des isolats H, J, K et N4 après une semaine d'incubation dans les milieux de culture appropriés, a révélé que ces isolats ont des capacités de biosynthèse de plusieurs enzymes intéressantes comme la lipase, la protéase, la xylanase et la cellulase (**Tableau 12**). Les isolats H et N4 synthétisent la xylanase, la cellulases et la lipase (**Figures 25, 26 et 27**). L'isolat J est capable de produire la lipase et la protéase (**Figure 27, Tableau 12**). L'isolat K produit une xylanase et une lipase (**Figures 25, 27**).

**Tableau 12:** Résultats du criblage enzymatique des isolats sélectionnés

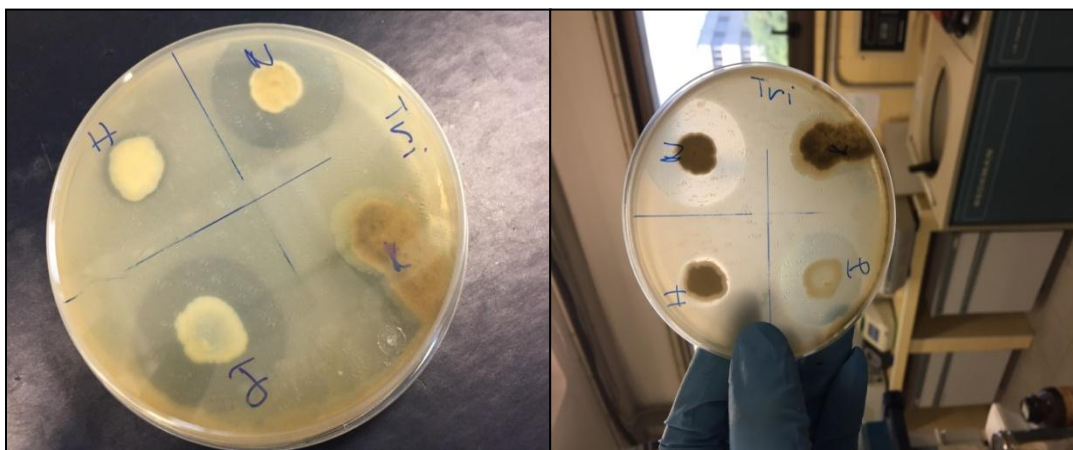
Isolats	Enzymes			
	Lipase	Protéase	Xylanase	Cellulase
H	+	-	+++	+
J	+++	+	-	-
K	+	-	+++	-
N4	+++	-	+++	+



**Figure 25.** Activité xylanolytique des isolats d'actinobactéries H,J,K et N4 sur milieu de culture LB additionné de substrat chromogène insolubles (AZCL-Xylane ) montrant les zones d'hydrolyses bleuâtres autour des colonies .



**Figure 26.** Activité cellulolytique des isolats d'actinobactéries H, J, K et N4 sur milieu de culture LB additionné de substrat chromogène insolubles (AZCL-Cellulose ) montrant les zones d'hydrolyses bleuâtres autour des colonies.



**Figure 27.** Activité lipolytique des isolats d'actinobactéries H, J, K et N4 sur milieu de culture LB additionné de tributyrine montrant les halos clairs autour des colonies.

Les enzymes microbiennes sont connues pour jouer un rôle crucial en tant que catalyseurs métaboliques dans plusieurs activités biochimiques. Elles sont utilisées maintenant, dans plusieurs applications industrielles car elles augmentent les vitesses de réaction plusieurs fois par rapport aux réactions chimiques normales (Ramírez et Calzadía, 2016).

Les actinobactéries sont les procaryotes les plus intéressants pour la production d'une large gamme d'enzymes. Ces bactéries et leurs enzymes, sont largement utilisés en industries, en environnements et en biotechnologies (Hirsch et Valdés, 2010; Yong-chao *et al.*, 2014; Camacho *et al.*, 2014; Minotto, 2014). Ces bactéries sont très utilisées dans ce domaine à cause de leurs bonnes productivités et répondent parfaitement à certaines techniques et exigences des industries. Ces bactéries sont également connues depuis longtemps comme de puissants dégradants de la biomasse végétale comme la lignine, la cellulose, le xylène, la pectine et d'autres polysaccharides complexes (Ramírez et Calzadía, 2016). De plus, leurs hétérogénéités biochimiques, leurs diversités écologiques et leurs capacités à produire des métabolites secondaires en font une source idéale pour la production d'enzymes (Minotto *et al.*, 2014). Depuis, sont continuellement criblées pour la production de protéases, cellulases, chitinases, amylases, xylanases et autres enzymes (Govindharaj *et al.*, 2016).

De nombreuses études se sont concentrées sur la compréhension de la diversité des actinobactéries dans des écosystèmes extrêmes tels que les sources chaudes et sont régulièrement criblées pour la production de nouvelles enzymes. D'ailleurs, récemment plusieurs enzymes intéressantes sur le plan industriel, biotechnologiques et biomédical, ont été signalées à partir de plusieurs genres d'actinobactéries et en particulier les espèces du genre *Streptomyces* isolées des sources chaudes (Sahay *et al.*, 2017; Alrumman *et al.*, 2018; Amrita *et al.*, 2018; Fitri *et al.*, 2019). Les bactéries thermophiles sont une source potentielle d'enzymes hydrolytiques intéressantes produites dans des conditions écologiques exceptionnelles (Kumar *et al.*, 2019).

La présente étude a révélé que les isolats sélectionnés isolés des sources chaudes sont producteurs d'enzymes importantes (**Tableau 12**). Cette caractéristique métabolique est due peut-être en raison du fait que ces biotopes comportent des molécules organiques spéciales induisant la production enzymatique bactérienne (Menasria *et al.*, 2019). Nos résultats montrent que nos isolats représentés principalement par des *Streptomyces*, produisent au moins deux enzymes extracellulaires. Les isolats H et N4 isolées de la même source chaude (Frères chaouch) se sont montrés producteurs de presque toutes les enzymes recherchées. Ils ont été assignés respectivement aux espèces *Streptomyces flavoviridis* et *Streptomyces*

*griseoflavus* connues pour leurs production d'importantes enzymes (Tang-um et Niamsup, 2012 ; Adam *et al.*, 2016; Hosseini *et al.*, 2016; Azat *et al.*, 2019).

Des études sur les sources chaudes algériennes ont conduit à l'isolement et à l'identification des bactéries thermophiles capables de produire un mélange d'enzymes hydrolytiques qui peuvent être utiles à des fins biotechnologiques (Bouanane *et al.*, 2010 ; Mokrane *et al.*, 2017; Gomri *et al.*, 2018 ; Benammar *et al.*, 2020).

Récemment, dix-sept isolats actinobactériens thermophiles isolés à partir des échantillons de sols prélevés dans les geysers Cisolak à Java occidental, en Indonésie, ont été criblés pour leur aptitude à dégrader le xylane et la cellulase. Les résultats ont indiqué que ces isolats sont capables de produire cet enzyme extracellulaire à des températures élevées de 45°C, 50°C, 55°C et 60°C (Setyaningsih *et al.*, 2019; Rachmania *et al.*, 2020). Également, une autre étude portant sur le criblage des isolats actinobactériens thermophiles isolés par des méthodes de culture à partir d'une source chaude située à Aceh Besar en Indonésie a montré que 4 isolats sont capables de synthétiser des protéases (Fitri *et al.*, 2019).

Les micro-organismes extrémophiles peuvent se développer dans des conditions extrêmes de température, de salinité, de pH et de pressions élevées. Un intérêt particulier pour les applications industrielles des extrémophiles émerge au cours des dernières décennies. Les raisons principales se résument aux aptitudes de ces bactéries à produire de nouveaux biocatalyseurs fonctionnant dans des conditions physico-chimiques, extrêmes (Menasria *et al.*, 2019). En plus, les thermozymes offrent des caractéristiques uniques, telles que la stabilité à des températures élevées, à des produits chimiques et à des pH variés. Ces caractéristiques importantes, peuvent être adaptées aux industries alimentaires, pharmaceutiques, chimiques, traitement textile, production de biocarburants, traitement des déchets etc (Han *et al.*, 2019).

### 3-7 Criblage de l'activité antimicrobienne

Les tests d'antagonisme *in vitro* des isolats d'actinobactéries sélectionnés vis-à-vis de certains microorganismes tests, ont été effectués par la technique des cylindres d'agar qui est une méthode de diffusion en milieu gélosé (**Figures 31, 32**). Cette technique facile à réaliser, nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des isolats testés vis-à-vis des bactéries et des champignons tests utilisés. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau 13**. Il en ressort, que tous les isolats d'actinobactéries sélectionnés se sont révélés actifs contre au moins trois microorganismes testés. Ils sont cependant, inactifs contre *Escherichia coli* et *Citrobacter sp.* L'activité antagoniste la plus importante est présentée par l'isolat H qui possède un pouvoir antagoniste vis-à-vis de la majorité des bactéries testées (**Tableau 13**).

Les seuls isolats qui présentent une activité antifongique contre les champignons testés dans cette étude, sont les isolats H, K et N4.

Nous constatons d'après ces résultats, que l'activité antibiotique des actinobactéries testés est très hétérogène (**Figures 28, 29, 30**). En effet, l'isolat H montre des activités antibactériennes et antifongiques à la fois, cet isolat a pu inhiber les souches Gram-positif *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, en plus des souches Gram-négatif *Morganellasp*, *Proteus sp* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec un diamètre identique de la zone d'inhibition de (6mm). L'isolat H possède une activité antifongique contre les deux champignons testés *Aspergillus Niger* et *Fusarium oxysporum* avec respectivement des zones d'inhibition de 8 et 10 mm de diamètre. L'isolat J s'est montré efficace uniquement contre les bactéries à Gram-positif testées *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec respectivement des zones d'inhibition importantes de 15, 8 et 14mm de diamètre. Aucune activité antifongique n'a été détectée, pour cet isolat. Les isolats K et N4 possèdent une activité antibactérienne contre seulement *Bacillus subtilis* avec respectivement une zone d'inhibition de 6 et 8 mm de diamètre. Ces deux isolats possèdent aussi une activité antifongique contre *Aspergillus Niger* avec respectivement des auréoles de 7 et 6 mm de diamètres et contre *Fusarium oxysporum* avec un diamètre de 6 mm. La formation de zones d'inhibition résultant de la production de métabolites secondaires a été observée chez tous les isolats testés. Les résultats montrent que la majorité des isolats d'actinobactéries sont efficace contre les bactéries Gram-positif, tandis que les bactéries à Gram-négatif, se sont montrées insensibles aux sécrétions des isolats d'actinobactéries sauf pour l'isolat H. La raison de la sensibilité différente entre les bactéries Gram-positif et les bactéries Gram-négatif pourrait être attribuée aux différences morphologiques de leur membrane externe (Pandey *et al.*, 2011). Les bactéries Gram-positif sont pourvues d'une couche de peptidoglycane et dépourvues de lipopolysaccharide (LPS) qui caractérise les bactéries Gram-négatif. Cette couche rend la membrane cellulaire imperméable aux substances lipophiles (Kim *et al.*, 1994). Il est également possible que les bactéries Gram-négatives aient acquis les gènes résistants des cellules bactériennes résistantes voisines dans l'environnement précédent (Jorgensen et Ferrar, 2009). Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui évoquent la sensibilité des bactéries à Gram-positif aux sécrétions des actinobactéries par rapport aux bactéries à Gram-négatif (Sabaou *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 2002; Cwala *et al.*, 2010 ; Nurkanto *et al.*, 2012).

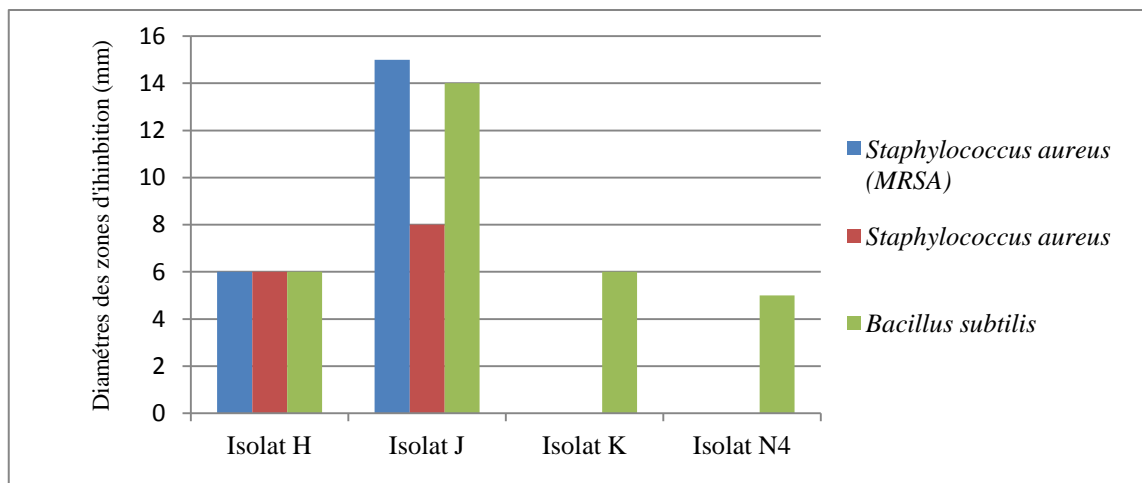
Certains de nos isolats d'actinobactéries testés, possèdent également une activité antifongique contre les champignons testés. Ce résultats s'accorde avec ceux de plusieurs



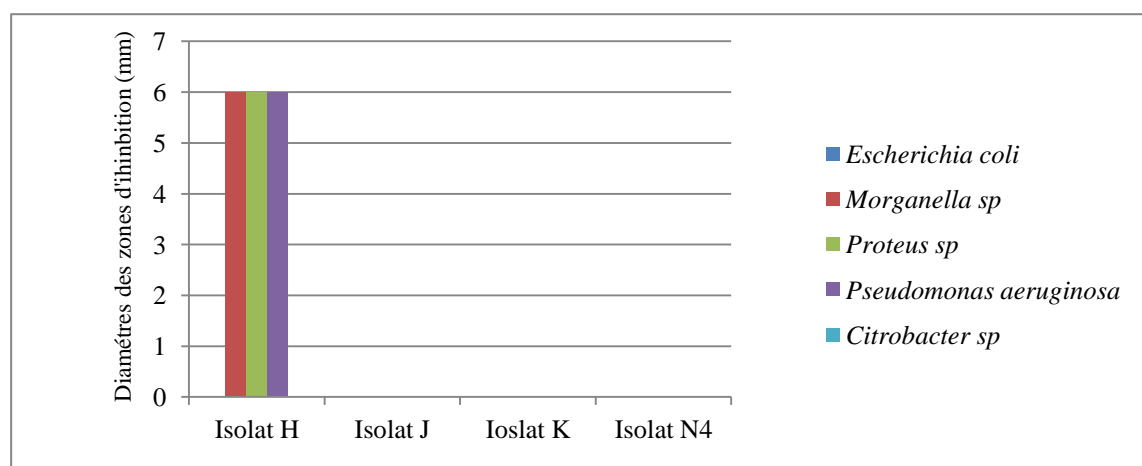
chercheurs, qui stipulent que cette activité est très répandue chez les actinobactéries (Dhanasekaran *et al.*, 2009). Elle a été utilisée dans les recherches qui s'intéressent aux phytopathogènes tel que: *Verticillium dahliae* (Entry *et al.*, 2000a; Entry *et al.*, 2000b; Harir *et al.*, 2017), *Phytophthora sp* (Xiao *et al.*, 2002) et *Fusarium oxysporum* (Getha et Vikineswary, 2002). Cette activité antibiotique serait liée probablement à la sécrétion de substances antifongiques (Badji *et al.*, 2005), ou bien suite à l'action mycolytique de ces bactéries, par la sécrétion d'enzymes lytiques comme les chitinases, qui dégradent la chitine présente par la paroi des champignons (Mane et Deshmukh, 2009). Par ailleurs, il est à signaler que certains champignons possèdent la capacité de synthétiser des enzymes, qui inactivent l'antibiotique biosynthétisé par les actinobactéries et ce, en modifiant sa structure chimique (Asselineau et Zalta, 1973).

**Tableau 13** : Résultats de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries vis-à-vis des microorganismes testés.

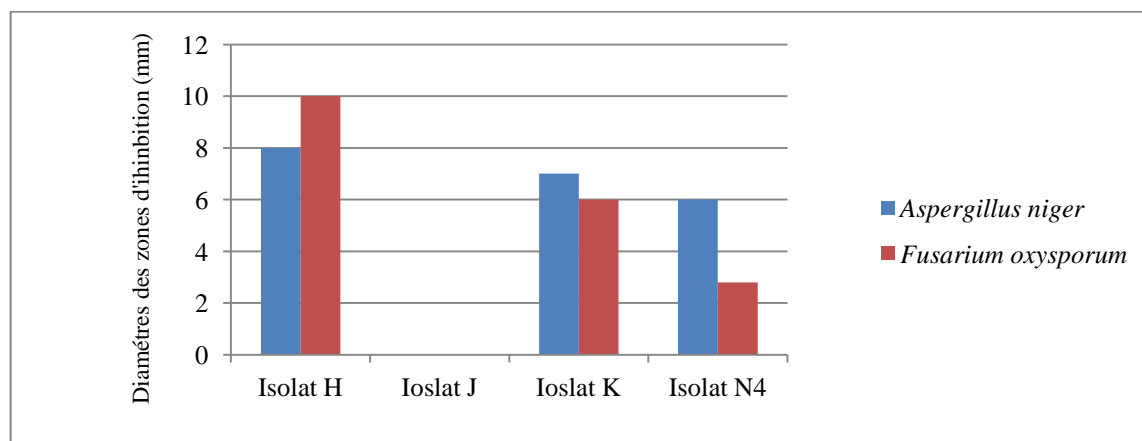
Microorganismes cibles	Diamètre de zone d'inhibition (mm)			
	H	J	K	N4
<b>Bactéries Gram-positif</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	06	15	00	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	06	08	00	00
<i>Bacillus subtilis</i>	06	14	06	08
<b>Bactéries Gram-négatif</b>				
<i>Escherichia coli</i>	00	00	00	00
<i>Morganellasp</i>	06	00	00	00
<i>Proteussp</i>	06	00	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	06	00	00	00
<i>Citrobactersp</i>	00	00	00	00
<b>Champignons filamenteux</b>				
<i>Aspergillus niger</i>	08	00	07	06
<i>Fusariumoxysporum</i>	10	00	06	06



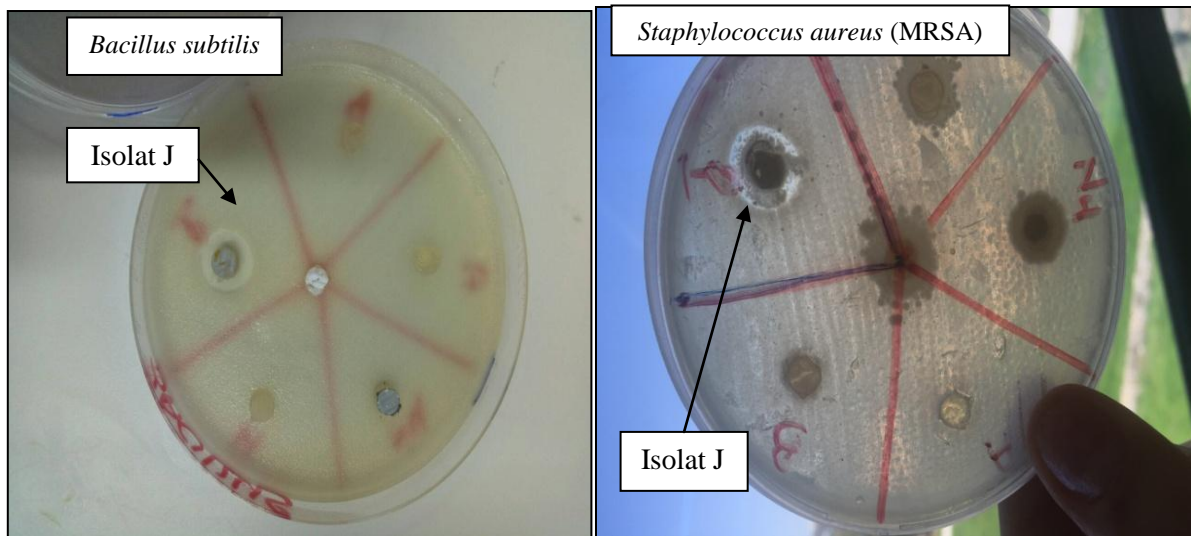
**Figure 28.** Activité antibactérienne des isolats H, J, K et N4 vis-à-vis des bactéries Gram-positif.



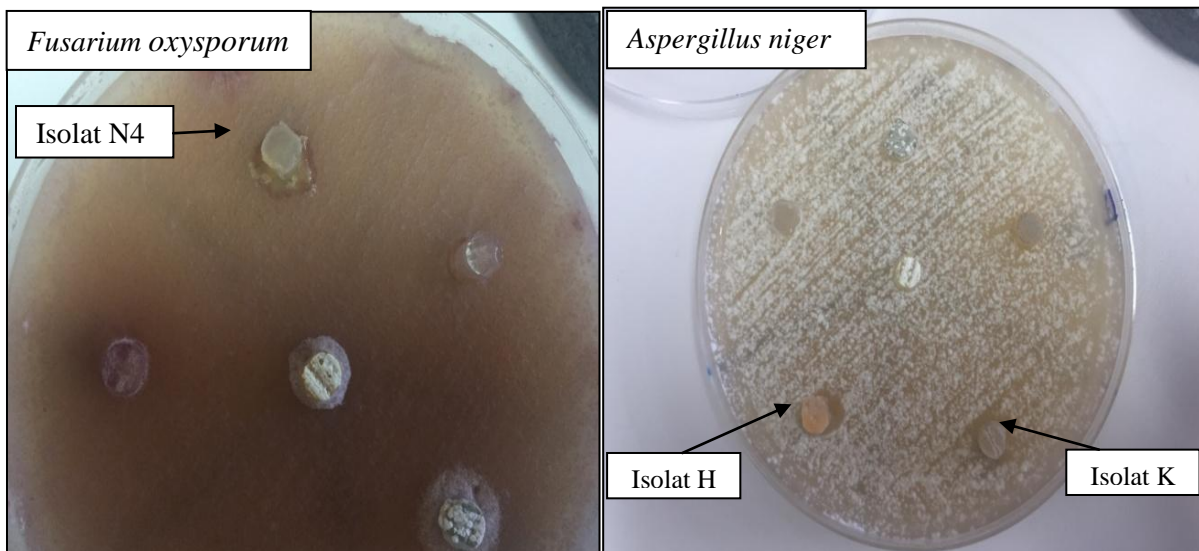
**Figure 29.** Activité antibactérienne des isolats H, J, K et N4 vis-à-vis des bactéries à Gram-négatif.



**Figure 30.** Activité antibactérienne des isolats H, J, K et N4 vis-à-vis des champignons filamenteux.



**Figure 31.** Activité antibactérienne de l'isolat J vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (MRSA) par la technique des cylindres d'agar.



**Figure 32.** Activité antifongique des isolats N4, H et K vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* par la technique des cylindres d'agar.

Les récentes stratégies de recherche de nouveaux germes possédant des capacités métaboliques à produire de nouvelles biomolécules comme les antibiotiques, consiste à explorer les écosystèmes les plus extrêmes. Dans ces investigations, la diversité des actinobactéries vivant dans les sources thermales a été étudiée. Cette stratégie a été adoptée dans de rares travaux, elle s'est soldée par la découverte de nouvelles bactéries possédant des aptitudes de production de nouveaux antibiotiques (Müller et Wink, 2013). Le besoin de nouveaux antibiotiques s'est fait ressentir ces dernières années, en raison de l'émergence accrue d'organismes multirésistants et de nouveaux agents pathogènes. Les actinobactéries produisent environ les deux tiers de tous les antibiotiques connus, dont 80% des antibiotiques

proviennent du genre *Streptomyces* et des actinobactéries rares, tels que *Actinomadura* (Letizia *et al.*, 2016), Récemment, plusieurs chercheurs ont montré le potentiel des sources thermales en tant que réservoirs d'actinobactéries producteurs de composés antimicrobiens très prometteurs (Uzel *et al.*, 2011, Pednekar *et al.*, 2011; Thawai, 2012 ; Naif *et al.*, 2016 ; Hussein *et al.*, 2018).

La technique des cylindres d'agar expérimentée est estimée efficace et permet une meilleure visualisation des zones d'inhibition. Cette méthode fait intervenir des cultures mixtes (présence de germes cibles et l'actinobactéries à tester). La présence de ses deux protagonistes dans un même écosystème stimule la production des métabolites secondaires (substances bioactives) souvent considérées comme moyen de défense chimique chez certaines souches d'actinobactéries. Les mécanismes qui régissent les interactions entre les deux protagonistes sont complexes (Marmann *et al.*, 2014). La stratégie de co-culture stimule partiellement un scénario écologique en temps réel dans lequel les microbes interagissent dans un espace tridimensionnel (Usama Ramdan *et al.*, 2015). D'après, Moody, 2014 la culture combinée d'une *Streptomyces* endu S-522 avec *Tsukamurella pulmonis* avait entraîné une production d'un nouvel antibiotique l'alchivemycine A(6), ayant une importante activité antibiotique vis-à-vis de *micrococcus luteus*.

# Conclusion et Perspectives

---

## Conclusion et perspectives

Les applications biotechnologiques associées aux actinobactéries et à leurs produits ont conduit à des efforts de recherches étendus et intensifs sur la biodiversité de ces bactéries dans les différents écosystèmes et plus spécialement durant les dernières décennies dans les environnements extrêmes. Ces niches écologiques très rudes avec une apparence stérile, ont montrées une biodiversité microbienne importante et variée avec un potentiel immense dans la production de multiples biomolécules. Ces microbes sont dotés d'aptitudes métaboliques variés qui leurs sont nécessaires pour une adaptation dans ces milieux très inhospitalier.

Les actinobactéries ont fourni et continuent à enrichir l'arsenal en différentes molécules et composés très importants de tout point de vu. Ces recherches ont été remarquablement fructueuses, dans la production de plusieurs molécules à grande valeur commerciale comme par exemple les enzymes et les antibiotiques. Quelques rares travaux antécédents, montrent que ces biotopes extrêmes, offre une biodiversité insoupçonnée d'actinobactéries. Ces bactéries restent cependant très mal explorées et exploitées. Les espèces provenant d'environnements chauds et hautement thermophiles fournissent des produits qui peuvent tolérer des températures très élevées tout en présentant une assez bonne activité.

La présente étude visait à révéler la biodiversité des actinobactéries dans les sources thermales de l'est de l'Algérie. En utilisant des méthodes d'isolement conventionnelles et des méthodes taxonomiques moléculaires, nous avons pu évaluer dans les sources chaudes algériennes, la diversité taxonomique et métabolique des actinobactéries.

Le protocole d'isolement adopté impliquant l'utilisation des milieux de culture spécifiques nous a permis d'isoler vingt-neuf isolats, présentant des caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques typiques des actinobactéries. D'après cette étude, les milieux de cultures SCA et AIA sont les plus favorables pour l'isolement des actinobactéries à partir de ces écosystèmes. Vingt-deux isolats d'actinobactéries soit 75.86% sont obtenus à partir de la source thermale des Frères Chaouch situé à Teleghma (Mila), 4 isolats d'actinobactéries soit 13.79% proviennent de la source thermale de Béniharoun (Mila) et 3 isolats d'actinobactéries soit 10.34% sont récupérés de la source thermale Essalihine (Khenchela). Ce nombre d'actinobactéries peut d'après nous augmenter en variant plusieurs facteurs comme la nature de l'échantillon, le choix des milieux de culture et le protocole et les conditions d'isolement.

L'identification préliminaire fondée sur leurs aspects morphologiques les a rapprochés aux genres *Streptomyces*, *Rhodococcus* et *Rathayibacter*. L'approche moléculaire, par le séquençage du gène ADNr 16S, nous a permis de confirmer et de déterminer le statut taxonomique de nos isolats. En effet, les vingt isolats appartiennent à trois genres d'*Actinobacteria* ce sont des (*Streptomyces*, *Rhodococcus* et *Rathayibacter*). 91% des isolats appartiennent au genre *Streptomyces* révélant ainsi son abondance par rapport aux autres genres d'actinobactéries cultivables isolées de cet écosystème extrême. Le reste est attribué aux genres *Rathayibacter* et *Rhodococcus*. Ce résultat très intéressant, montre pour la première fois selon nos connaissances, que le criblage orienté, entrepris dans nos investigations, révèle la présence d'un nombre important d'actinobactéries dans ces eaux chaudes. En outre, l'isolement de certaines espèces de *Streptomyces* et de certains genres rares jamais décrits dans les eaux thermales, constitue certainement, une autre originalité pas des moindres dans le domaine de l'écologie microbienne.

4 isolats d'actinobactéries, nommés H, J, K et N4 ont été choisis pour une caractérisation et une exploration plus approfondie de leurs potentialités métaboliques. La caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB), de ces isolats nous a permis de les rapprocher au genre *Streptomyces*. Ce sont surtout les aspects de la morphologie des mycéliums et l'aspect des chaînes de spores de ces isolats, qui nous ont orientés vers cette identification. L'identification moléculaire, la présence du LL-DAP, dans la paroi cellulaire, le profil des sucres, la présence de phospholipides principalement de type phosphatidyléthanolamine (PE) et diphosphatidylglycérol (DPG), La détection de ménaquinones MK-9 (H6) et MK-9 (H8) et le profil des acides gras de la paroi cellulaire des isolats, nous a permis de les assigner respectivement à *Streptomyces flavoviridis*, *Streptomyces pseudogriseolus*, *Streptomyces olivaceus* et *Streptomyces griseoflavus*.

La valeur du coefficient de Chargaff (GC%) bas des deux actinobactéries H et J est un résultat innovant. Il montre que certains de ces bactéries isolées à partir des eaux thermales peuvent présenter des GC% relativement faibles par rapport aux valeurs habituelles des actinobactéries décrites dans la littérature. Ces résultats sont en accord avec les rares rapports qui signalent ce nouveau groupe d'actinobactéries à faible GC%.

La caractérisation physiologique a catégorisé nos 4 isolats comme étant des actinobactéries halotolérants, qui tolèrent des concentrations en sel élevées. Les isolats H et J tolèrent 7% de NaCl alors que les isolats K et N4 tolèrent 10% de NaCl. Ce résultat très

intéressant, nous permet de prédire que ces souches tolèrent des variations multiples de concentration de sel. Ce qui leurs permettent de vivre dans plusieurs écosystèmes hydrique ou tellurique, présentant des quantités en sel variées.

Nos souches sont également classées parmi les bactéries thermophiles facultatives. Cette caractéristique physiologique est très appréciée par les écologistes. Car ces souches peuvent s'adapter à des plages de températures assez étendues et peuvent par conséquent se développer dans plusieurs niches écologiques.

Nos souches ressemblent par leurs profil vis-à-vis du pH, à celles isolées à partir des autres écosystèmes hydriques et telluriques, en préférant un pH alcalin.

Le criblage des potentialités hydrolytiques de ces isolats ont montré que nos isolats sont capables de dégrader des composés organiques complexes grâce à la production des enzymes hydrolytiques tels que la cellulase, lipase, protéase et xylanase. Ils sont capables de produire une variété très importante d'enzymes. L'isolat H est doté de 14 activités enzymatiques, l'isolat J détient 24 activités enzymatiques, l'isolat K est positif pour 21 activités et l'isolat N4 possède 18 activités enzymatiques différentes.

L'activité antibiotique est également présente chez nos isolats. Ils présentent des activités contre des bactéries pathogènes et certains champignons.

Ce travail, de bioprospection des actinobactéries dans les sources thermales constitue d'après nous, un thème original. Les résultats obtenus sont prometteurs et encourageants avec des retombées taxonomiques, biotechnologiques et environnementales certaines. La diversité des espèces recensées dans ces biotopes, constitue une ressource importante et supplémentaire, de biomolécules thermorésistantes très recherchées.

Néanmoins, d'autres études et stratégies peuvent être proposées, afin d'étudier d'une manière plus approfondie, la biodiversité microbienne et métabolique de ces bactéries. Nous proposons les perspectives suivantes afin de répondre à ces attentes:

-Les techniques d'échantillonnages et d'isolement, peuvent contribuer à la réussite de la recherche de ces bactéries. Nous proposons dans ce contexte d'explorer plusieurs autres sites et de réaliser des filtrations de grandes quantités d'eaux, afin de concentrer la charge microbiennes dans les filtres (isolement par filtration,...). L'emploi d'autres milieux spécifiques d'isolement est également une stratégie à ne pas écarter.



- Compléter la caractérisation génotypique par d'autres techniques en l'occurrence l'hybridation ADN/ADN, le séquençage des gènes de ménage, ainsi que le recours à l'approche métagénomique pour cibler directement les communautés des actinobactéries cultivables et non-cultivables ainsi que leurs gènes.
- Etudier la corrélation entre la distribution des actinobactéries isolés et leurs sites d'échantillonnage.
- Des études plus approfondies portant sur la caractérisation des molécules bioactives hydrolytiques et antimicrobiennes sécrétées par nos isolats doivent être établis. Il s'agit de caractériser ces biomolécules d'intérêts, d'optimiser leur production et mettre en épreuves leur thermostabilité.
- Explorer de nouvelles potentialités de nos isolats telles que la capacité à biodégrader les polluants (BTEX, pesticides,...).

## Références Bibliographiques

---

## A

- Adam J., Lewin, Gina R., McDonald, Bradon R., Takasuka, Taichi E., Wendt-Pienkowski, Evelyn, Doering, Drew T., Suh, Steven, Raffa, Kenneth F., Fox, Brian G., and Currie, Cameron R. (2016). Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinated gene expression. United States: N. p.
- Adekambi, Toïdi., Ray W, Butler., Finnian, Hanrahan., Arthur L, Delcher., Michel, Drancourt., Thomas M, Shinnick. (2011). Core gene set as the basis of multilocus sequence analysis of the subclass *Actinobacteridae*. *PLoS One*.6:e14792.
- Aditi, Agarwal., Nupur, Mathur.(2017).Thermophilic Actinomycetes are potential source of novel bioactive compounds: A review, *ejpmr*. 3(2), 130-138.
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., Sastry, M. (2003a).Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycetes *Thermomonospora spp*. *Langmuir* .19: 3550–3553.
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., Sastry, M. (2003b).Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant *actinomycete Rhodococcus* species. *Nanotechnology* .14: 824–828.
- Alain K., Zbinden M., Le Bris N., Lesongeur F., Quérellou J., Gaill F., Cambon-Bonavita M.A. (2004). Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Env.Microbiol*.6. 227-241.
- Alain, K., Querellou, J. (2009).Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*.13:583–594.
- Alderson, G., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. (1985). Menaquinone Composition in the Classification of *Streptomyces* and Other *Sporoactinomycetes*. *Microbiology*, 131(7):1671-1679.
- Al-Diwany, L.J, Unsworth, B.A, Cross, T. (1978).A comparison of membrane filters for counting *Thermoactinomyces* endospores in spore suspensions and river water. *J. Appl. Bacteriol*. 45(2):249-258.
- Allan, Pentecost., Jones, B., Renaut, R.W. (2003) .What is a hot spring ? fournit de la source chaudes. *Can. J. Earth*. 40 (11): 1443-1446.
- Alrumman Sulaiman Mostafa Yasser, S., Mostafa Al-Qahtani, Shekha., Taha Tarek, H. (2018).Hydrolytic Enzyme Production by Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Open Life Sciences*. 13(1): 470-480.
- Amarouche-Yala S., Benouadah, A., El Ouahab , B.A., Moulla, A.S., Ouarezki, S.A., Azbouche, A. (2015). Physicochemical, bacteriological, and radiochemical characterization of some Algerian thermal spring waters. *Water Qual Expo Health*. 7:233- 249.
- Amrita Kumari Panda., Satpal Singh Bisht., Mahendra Rana., Surajit De Mandal., Nachimuthu Senthil Kumar, (2018). Chapter 10 - Biotechnological Potential of Thermophilic *Actinobacteria* Associated With Hot Springs, Editor(s): Bhim Pratap Singh, Vijai Kumar Gupta, Ajit Kumar Passari, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, *Elsevier*, Pages 155-164.

Anderson, A.S., Wellington, E.M.H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*51:797-814.

Arab, M., Bakour, S., Lalaoui, R., Aissaoui, N., Nas, F., Hoceini, A., Fournier, P., Klouche-khelil, N . (2018). Diversity of aerobic bacilli analysis using molecular and culture-based approaches in Debagh hot spring diversity of aerobic bacilli analysis using molecular and culture-based. *Geomicrobiol .J* .36: 1–11.

Asano, K., Masunaga, I., Kawamoto, I. (1989). *Catellatospora matsumotoense sp. nov.* and *C. tsunoense sp. nov.*, actinomycetes found in woodland soils. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:309–313.

Asselineau U, J., J. P. Zalta. (1973). Les Antibiotiques, *Herman*, Paris, p. 132.

Atlas, R. (1997). Principles of microbiology.WCB McGraw-Hill, New York, NY.

Azat, Gabdulkhakov Ilya, Kolyadenko ;Olga, Kostareva ; Alisa, Mikhaylina ; Paulo ,Oliveira, Paula Tamagnini Alexander Lisov., Svetlana, Tishchenko. (2019). Investigations of Accessibility of T2/T3 Copper Center of Two-Domain Laccase from *Streptomyces griseoflavus* Ac-993. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 3184.

Azimi, S., Basei Salehi., M., Bahador, N. (2017). Isolation and Identification of *Streptomyces ramulosus* from Soil and Determination of Antimicrobial Property of its Pigment. *Mod. Med. Lab. J.*1: 36–41.

## **B**

Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N. (2005). Activité antifongique d'une souche d'Actinomadura d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale.* 15 (4) : 211-219.

Bahn, Y. S., Park, J. M., Bai, D. N., Takase, S., and Yu, J. H. (1998). YUA001, a novel aldose reductase inhibitor isolated from alkalophilic *Corynebacterium* sp. YUA25 I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* 51: 902–907.

Banerjee, A., Sharma, R., and Banerjee, U. C. (2002). The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 : 33–44.

Barabote, R. D., Xie, G., Leu, D. H., Normand, P., Necsulea, A., Daubin, V., et al. (2009). Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Res.* 19, 1033–1043.

Baranasic, D., Gacesa, R., Starcevic, A., Zucko, J., Blazic, M., Horvat, M., et al. (2013). Draft genome sequence of *Streptomyces rapamycinicus* Strain NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin. *Genome Announc.* 1, 1–2.

Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klent, H.P., Clément, C., Ouhdouche, Y., Wezel, G.P van .(2016).Taxonomy, physiology and natural products of *Actinobacteria*. *Microbial. Mol. Biolrev.* 80 : 1 – 43 .

- Baskaran, R., Vijayakumar, R., Mohan, P. M. (2011).** Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malays J Microbiol.* 7: 22–28.
- Battistuzzi, F. U., Hedges, S. B. (2009).** A major clade of prokaryotes with ancient adaptation to life on land. *Mol. Biol. Evol.* 26, 335–343.
- Bekkouche, Med Fouzi. (2009).** Caractéristiques des sources thermales de la région d’Azzaba, chapitre1, p9, thèse magistère en hydrogéologie, département de géologie, université d’Annaba.
- Bekkouche, Med Faouzi. (2016).** Caractéristiques hydrochimiques des sources thermales de l’extrême Nord-Est Algérien. Thèse de Doctorat, Univ. Badji Mokhtar-Annaba. 178 p.
- Bekkouche, Med Fouzi. (2013).** Caractéristiques des Sources Thermales de la Région d’Azzaba. Le Séminaire International sur l’Hydrogéologie et l’Environnement.
- Bell, J. M., Colby, J., and Williams, E. (1988).** CO oxidoreductase from *Streptomyces* strain G26 is a molybdenum hydroxylase. *Biochem. J.* 250, 605–612.
- Benammar L., Menasria T., Chergui A., Benfiala S., Ayachi A. (2017).** Indoor fungal contamination of traditional public baths (Hammams). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 117:115–122.
- Benammar, L., İnan Bektaş, K., Menasria, T. et al. (2020).** Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Braz J Microbiol.* 51: 1987–2007.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., Ahmane, Z. (2019).** Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *J King Saud Univ Sci.* 31: 706–712.
- Bentley, S. D., Maiwald, M., Murphy, L. D., Pallen, M. J., Yeats, C. A., Dover, L. G., et al. (2003).** Sequencing and analysis of the genome of the Whipple’s disease bacterium *Tropheryma whippelii*. *Lancet* 361, 637–644.
- Berd, D. (1973).** Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *J. Appl. Microbiol.* 25:665–681.
- Bérdy, J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58:1–26.
- Bérdy, J. (2012).** Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J. Antibiot.* 65:385–395.
- Beveridge, T. J., and Murray, R. G. E. (1980).** Site of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 141: 876–887.
- Bibb, M.J. (2005).** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 208–215.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.

- Boer, L. D., Dijkhuizen, L., Grobben, G., Goodfellow, M., Stackebrandt, E., Parlett, J. H., et al. (1990). *Amycolatopsis methanolica* sp. nov. a facultatively methylotrophic actinomycete. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 194–204.
- Boondaeng, A., Ishida, Y., Tamura, T., Tokuyama, S., and Kitpreechavanich, V. (2009). *Microbispora siamensis* sp. nov., a thermotolerant actinomycete isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 : 3136–3139.
- Bouanane-Darenfed, A., Fardeau, L., Grégoire, P., Manon, J., Kebbouche-Gana, S., Benayad, T., et al., (2011). *Caldicoprobacter algeriensis* sp. Nov. A New Thermophilic Anaerobic, Xylanolytic Bacterium Isolated from an Algerian Hot Spring, *Current Microbiology.* 62: 826-832.
- Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghioua, S., Zerizer, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P. (2005) .Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J Mycol Med.* 15:39–44.
- Boudoukha A., Athamna M., Benaabidat L., (2015). Etude du potentiel hydrothermal de Hammam Sokhna. Est Algérien. *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, 24: 161-174.
- Boudoukha, A., Athamna, M. (2012). Caractérisation des eaux thermals de l'ensemble Sud Sétifien. Est Algérien. *Revue des sciences de l'eau.* 25 : 103-119.
- Bouizgarne, B., Ait Ben Aoumar, A. (2014). Diversity of plant associated Actinobacteria, p 41–100. In Maheshwari DK (ed), *Bacterial diversity in sustainable agriculture*. Springer International, Heidelberg, Germany.
- Boukhenfouf, W., Boucenna, A. (2019). Comparison of the radio-isotopic composition between hot spring water of Hammam Debagh and its associated deposits. *Radiat. Prot. Dosim.* 187:369–377.
- Brock, T. (1986). Introduction: an overview of the thermophiles. in Brock, T. *Thermophiles: general, molecular and applied microbiology*, John Wiley and Sons, New York. 2-15.
- Brock, TD. (1997). The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics*, 146:1207–1210.
- Brock, TD., Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, 98:289–297.
- Buchanan, R.E.(1917). Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. II. The primary subdivisions of the Schizomycetes. *J. Bacteriol.*, 2:155–164.
- Buchanan, R.E.(1955). Taxonomy. *Ann Rev Microbiol.* 9:1-20.
- Bull, A.T. (2011). Actinobacteria of the Extremobiosphere. In: Horikoshi K. (eds) *Extremophiles Handbook*. Springer. Japan, pp 1203–1240.
- Bull, AT., Stach, JE., Ward, AC., Goodfellow, M. (2005). Marine Actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *A Van Leeuw.*; 87(1):65-79.

C

- Camacho, AD., Martínez, L., Valdés, M., Ramírez-Saad, H., Valenzuela, R. (2014). Potencial de algunos microorganismos en el compostaje de residuos sólidos. *Terra Latinoamericana*; 32:291–300.
- Carrillo, L., Benítez Ahrendts, M. R., and Maldonado, M. J. (2009). Alkalithermophilic actinomycetes in a subtropical area of Jujuy, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 41, 112–116.
- Castany, G. (1967). *Traité Pratique des Eaux Souterraines*. Paris, France: Dunod.
- Castillo, U., Myers, S., Bwone, L., Strobel, G., Hess, W.M., Hanks, J., Reay, D. (2006). Scanning electron microscopy of some endophytic Streptomyces in Snakevine- *Kennedia niggricans*. *Scanning*, 27:305-311.
- Cavalla, M., Eberlin, T. (1994). Isolement des *Streptomyces* du sol. *L'operon*. 4:13–17.
- Challis, G.L, Hopwood, D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 100, (Suppl 2):14555–14561.
- Charousová, I., Medo, J., Halenárová, E., Javoreková, S. (2017). Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. *J. Adv. Pharm. Technol. Res*, 8(2):46-51.
- Charousová, Ivana., Medo, Juraj., Hleba, Lukáš., Cíсарová, Miroslava., Javoreková, Soňa. (2019). Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, e17249.
- Chater, K.F. (1972). A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol*, 72:9–28.
- Chater, K.F. (1979). *Streptomyces*. In: Parish (Eds.) *Development Biology of Prokaryotes* (edited by Parish JH). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 93–114.
- Chater, Keith.F., Govind, Chandra. (2006) .The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons , *FEMS Microbiology Reviews*. 30( 5): 651–672.
- Chaudhary, H.S., Yadav, J., Shrivastava, A.R., Singh, S., Singh, A.K., Gopalan, N. (2013). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *J. Adv. Pharm. Technol. Res*, 4(2):118-123.
- Chaudhary, N., Prabhu, S. (2016). Thermophilic Actinomycetes from Hot Water Spring Capable of Producing Enzymes of Industrial Importance. *Int J. Res. Stud. Biosci.* 4: 29–35.
- Chavan Dilip, V., Mulaje, S. S., Mohalkar, R.Y. (2013). A review on Actinomycetes and their biotechnological application, *IJPSR*, Vol. 4(5): 1730-1742.
- Chen, C. Y., Huang, Y. C., Wei, C. M., Meng, M., Liu, W. H., and Yang, C. H. (2013). Properties of the newly isolated extracellular thermo-alkalizable laccase from thermophilic

- actinomycetes, *Thermobifida fusca* and its application in dye intermediates oxidation. *AMB Express*, 3, 1–9.
- Chen, M. Y., Wu, S. H., Lin, G. H., Lu, C., P., and Lin, Y. T., Chang, W. C., et al. (2004). *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiationresistant species isolated from hot springs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1849–1855.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., and Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnol. Adv.* 33, 745–755.
- Chen, S., Su, L., Billig, S., Zimmermann, W., Chen, J., and Wu, J. (2010). Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 63, 121–127.
- Chertkov, O., Sikorski, J., Nolan, M., Lapidus, A., Lucas, S., Rio, T. G. D., et al. (2011). Complete genome sequence of *Thermomonospora curvata* type strain (B9T). *Stand. Genomic Sci.* 4, 13–22.
- Chitte, R. R., Deshmukh, S. V., Kanekar, P. P. (2011). Production, purification, and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from thermophilic *Streptomyces* sp. MCMB-379. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165: 1406–1413.
- Chitte, R. R., Dey, S. (2002). Production of a fibrinolytic enzyme by thermophilic *Streptomyces* species. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 289–294.
- Chun, J., Rainey, F.A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Claessen, D., Rozen, D.E., Kuipers, O.P., Sogaard-Andersen, L., van Wezel, G.P. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:115–124.
- Clark, D. A., Norris, P. R. (1996). *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology*, 141, 785–790.
- Claverias, F., Undabarrena, A., Gonzales, M., Seeger, M., Camara, B. (2015). Culturable diversity and antimicrobial activity of actinobacteria from marine sediments in Valparaiso Bay, Chile. *Front. Microbiol.* 6:737.
- Cockell, C. S., Kelly, L. C., and Marteinsson, V. (2013). *Actinobacteria* - an ancient phylum active in volcanic rock weathering. *Geomicrobiol. J.* 30, 706–720.
- Coker, J. A. (2016). Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000Res.* 5:396.
- Collins, M.D. (1994). Isoprenoid quinones, p 265–309. In Goodfellow M, O'Donnell AG (ed), *Chemical methods in prokaryotic systematics*. Wiley, Chichester, United Kingdom.



Collins, M.D., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Alderson, G. (1985). Menaquinone composition of mycolic acid-containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. *J. Appl. Bacteriol*, 58:77–86.

Collins, M.D., Smida, J., Dorsch, M., Stackebrandt, E. (1988). *Tsukamurella* gen. nov., harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 38:385–391.

Colwell, R.R. (1970). Polyphasic taxonomy of bacteria. In Culture Collections of Microorganisms. H. Iizuka, and T. Hazegawa (eds). Tokyo, Japan: University of Tokyo Press, pp. 421–436.

Corbaz, R., Gregory, P. H., Lacey, M. E. (1963). Thermophilic and mesophilic actinomycetes in mouldy hay. *J. Gen. Microbiol.* 32, 449–455.

Cross T. (1981). Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol*, 50(3):397-423.

Cross, T., Goodfellow, M. (1973). Taxonomy and classification of the actinomycetes. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 2:11–112.

Cundell, D.R., Piechoski, M.P.(2016). Potentially novel Actinobacteria derived antibiotics from unique microenvironments. In: Antimicrobials Synthetic and Natural Compounds. (Dhanasekaran et al., Eds), pp: 83-98, CRC Press, New York.

Cwala, Z., Igbinsosa, E.O., Okoh, A.I. (2010). Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. *Afr.J. Pharm. Pharmacol*, 5:118–24.

## D

Dastager, S., Dayanand, L.W.J.A., Tang, S.K., Tian, X.P., Zhi, X.Y., Xu, L.H, Jiang, C. (2006). Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *Afr.J. Biotechnol*, 5:1131–1134.

Dastager, S.G., Kim, C.J., Lee, J.C., Agasar, D., Park, D.J., Li, W.J. (2008). *Streptomyces deccanensis* sp.nov., an alkaliphilic species isolated from soil. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol*, 58: 1089-1093.

Dauga, C., Doré, J., Abdelghani, S. (2005). La diversité insoupçonnée du monde microbien. *M/S. medicine. Sci.* 21 :227–333.

Demir, T., Gübe, Ö., Yücel, M., Hames-Kocabas, E. E. (2013). Increased alkalotolerant and thermostable ribonuclease (RNase) production from alkaliphilic *Streptomyces* sp. M49-1 by optimizing the growth conditions using response surface methodology. *World J. Microbiol.Biotechnol.* 29, 1625–1633.

Devi, G. Y., Kumar, L. B., Lokeswari, N., Arjun, P., HaraSriRamulu, S. (2013). Isolation of the marine actinomycetes from the bay of Bengal sediments. *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.* 3 :121–123.

Dewendar, A., Mourad, F. E., and Sheha, H. (1979). Thermomonospora sp. TSA-125 and its production of a growth promoting antibiotic. *Folia Microbiol.* (Praha) 24:396–402.

- Dhanasekaran, D., Panneerselvam, A., Thajuddin, N., Chandralekha, S. (2014). Isolation, characterization of antibacterial methyl substituted  $\beta$ -lactam compound from *Streptomyces noursei* DPTD21 in saltpan soil, India. *JBAPN*, 4(2):71-88.
- Dhanasekaran, D., Rajakumar, G., Sivamani, P., Selvamani, S., Panneerselvam, A., Thajuddin N. (2005). Screening of salt pans actinomycetes for antibacterial agents. *Internet. J. Microbiol*, 1(2):1-8.
- Dhanasekaran, D., Sakthi, V., Thajuddin, N., Panneerselvam, A. (2010). Preliminary evaluation of Anopheles mosquito larvicidal efficacy of mangrove *Actinobacteria*. *Int.J.Appl .Biol.Pharm.Technol*. 1(2):374-381.
- Dhanasekaran, D., Selvamani, S., Panneerselvam, A., Thajuddin, N. (2009) Isolation and characterization of actinomycetes in Vellar Estury, Annagkoil, Tamilnadu. *Afric. J. Biotechnol*. 8:4159-4162.
- Diab, A., Al-Gounaim, M. Y. (1985). Thermotolerant actinomycetes in soil and rhizosphere of plant communities in the desert of Kuwait. *J. Univ. Kuwait (Sci)*. 12 : 69-76.
- Dib, H. (2004). Le thermalisme de l'extrême Est Algérien : Guelma, Souk Ahras, Skikda et Dietz, A., Mathews, J. (1971). Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl. Microbiol*. 21:527-533.
- Dietz, A., Mathews, J. (1977). Characterization of Hairy-Spored Streptomyces: II. Twelve Additional Cultures, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 27: 282-287.
- Dimise, E. J., Widboom, P. F., Bruner, S. D. (2008). Structure elucidation and biosynthesis of fuscachelins, peptide siderophores from the moderate thermophile *Thermobifida fusca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15311-15316.
- Diraviyam, T., Radhakrishnan, M., Balagurunathan, R. (2011). Antioxidant activity of melanin pigment from *Streptomyces* species D5 isolated from Desert soil, Rajasthan, India. *Drug Discov. Today*, 3, 12-13.
- Donachie, W.D. (1993). The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol*, 47:199-230.
- Dou, W., Wei, D., Li, H., Li, H., Rahman, M. M., Shi, J., et al. (2013). Purification and characterisation of a bifunctional alginate lyase from novel *Isoptericola halotolerans* CGMCC5336. *Carbohydr. Polym*. 98, 1476-1482.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., Raoult D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol*. 38 (10):3623-3630.
- Duan, Y. Y., Ming, H., Dong, L., Yin, Y. R., Zhang, Y., Zhou, E. M., et al. (2014). *Streptomyces calidiresistens* sp. nov., isolated from a hot spring sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106: 189-196.

## E

- Edwards, C. (1993). Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 42:161-179.

Eisenhart, A. E., Disso, N. M. (2012). Thermostability determination of antibiotics at high temperatures by liquid chromatography-mass spectrometry, in Proceedings of the National Conference On Undergraduate Research (NCUR) 2012 (Ogden, UT: Weber State University), 351–356.

Elbendary, Afaf Ahmed., Ashgan, Mohamed Hessain., Mahmoud Darderi El-Hariri., Ahmed Adel Seida., Ihab Mohamed Moussa., Ayman Salem Mubarak., Saleh A. Kabli., Hassan A. Hemeg., Jakeen Kamal El Jakee. (2018). Isolation of antimicrobial producing *Actinobacteria* from soil samples, *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25(1): 44-46.

Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. (2002). A review on microbial alkaline proteases. *J. Sci. Ind. Res.* 61:690–704.

Elliot, M.A., Buttner, M.J., Nodwell, J.R. (2008). Multicellular development in *Streptomyces*, p 419–438. In Whitworth DE (ed), *Myxobacteria: multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, DC.

Ensign, J. C. (1978). Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Annual Reviews of Microbiology*. 32, 185-219.

Entry, J.A., R.K. Hubbard, J.E. Theis., J.J. Fuhrmann. (2000b). The influence of vegetation in riparian filterstrips on coliform bacteria: II. Survival in soils. *Journal of Environmental Quality*, 29:1215-1224.

Entry, J.A., R.K. Hubbard, J.E. Theis., J.J. Fuhrmann. (2000a). The influence of vegetation in riparian filterstrips on coliform bacteria: I. Movement and survival in water. *Journal of Environmental Quality*, 29:1206-1214.

Epstein, L. A., Chain, E. (1940). Some observations on the preparation and properties of the substrate of lysozyme. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 21, 339-345.

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

Euzéby, J.P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst .Bacteriol*, 47:590–592.

## **F**

Fekraoui, A., Kedaid, F. (2005). Geothermal resources and uses in Algeria: a country update report. *Proc. World. Geothermal. Congress*. 24–29.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4):783-791.

Fenchel, T. (2003). Biogeography for bacteria. *Science*, 301:925–926.

Fernández, M., Sánchez, J. (2002). Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology*, 148:405–412.

Ferreira, A. C., Nobre, M. F., Moore, E., Rainey, F. A., Battista, J. R., and da Costa, M. S. (1999). Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. *Extremophiles*, 3, 235–238.

Fink, J. N., Resnick, A. J., and Salvaggio, J. (1971). Presence of thermophilic actinomycetes in residential heating systems. *Appl. Microbiol.* 22, 730–731.

Fitri, L., Putri, K.A., Suhartono, Ismail, Y.S. (2019). Short Communication: Isolation and characterization of thermophilic actinobacteria as proteolytic enzyme producer from Ie Seuum Hot Spring, Aceh Besar, Indonesia. *Biodiversitas*. 20: 2802-2808.

Flärdh, K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:564–571.

Flärdh, K., Buttner, M.J. (2009). *Streptomyces morphogenetics*: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:36–49.

Fujii, Y., Kabumoto, H., Nishimura, K., Fujii, T., Yanai, S., Takeda, K., et al. (2009). Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D3 hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385: 170–175.

## G

Gabani, P., Copeland, E., Chandel, A. K., Singh, O. V. (2012). Ultraviolet radiation-resistant isolates revealed cellulose-degrading species of *Cellulosimicrobium cellulans* (UVP1) and *Bacillus pumilus* (UVP4). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 59, 395–404.

Gacesa, P. (1992). Enzyme degradation of alginates. *Int. J. Biochem.* 24: 545–552.

Gadkari, D., Schricker, K., Acker, G., Kroppenstedt, R. M., and Meyer, O. (1990). *Streptomyces thermoautotrophicus* sp. nov., a thermophilic CO<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>-oxidizing obligate chemolithoautotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3727–3734.

Gao, B., and Gupta, R. S. (2005). Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum *Actinobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2401–2412.

Gao, B., Gupta, R.S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76:66–112.

Garcia, S. L. et al. (2012). Metabolic potential of a single cell belonging to one of the most abundant lineages in freshwater bacterioplankton. *The ISME Journal*.

Gardner, H. L., Dukes, C. D. (1955). *Haemophilus vaginalis vaginitis*. A newly defined specific infection previously classified 'non-specific' vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 69, 962–976.

Getha, K., Vikineswary, S. (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* , 28, 303 – 310.

- Ghai, R. et al. (2011). Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. *PLoS One*, 6, e23785.
- Ghai, R., McMahan, K. D., Rodriguez-Valera, F. (2012). Breaking a paradigm: cosmopolitan and abundant freshwater actinobacteria are low GC. *Environmental Microbiology Reports*. 4, 29–35.
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H., Mousavi, M. (2014). Carotenoid production from hydrolyzed molasses by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 using batch, fed-batch and continuous culture. *Ann. Microbiol.* 64: 945–953.
- Gholami, M., Etemadifar, Z., and Bouzari, M. (2015). Isolation a new strain of *Kocuria rosea* capable of tolerating extreme conditions. *J. Environ. Radioact.* 144, 113–119.
- Girard, G., Traag, B.A., Sangal, V., Mascini, N., Hoskisson, P.A., Goodfellow, M., van Wezel, G.P. (2013). A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open. Biol.* 3:130073.
- Girard, G., Willemse, J., Zhu, H., Claessen, D., Bukarasam, K., Goodfellow, M., van Wezel, G.P. (2014). Analysis of novel kitasatosporae reveals significant evolutionary changes in conserved developmental genes between *Kitasatospora* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106:365–380.
- Glymph, J. L., Stutzenberger, F. J. (1977). Production, purification, and characterization of alpha-amylase from *Thermomonospora curvata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 391–397.
- Gohel, S. D., Singh, S. P. (2012a). Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis alba* OK-5. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 889–890: 61–68.
- Gomri, M.A, Khaldi, T.E.M., Kharroub, K. (2018). Analysis of the diversity of aerobic, thermophilic endospore-forming bacteria in two Algerian hot springs using cultural and non-cultural methods. *Ann. Microbiol.*, 68:915–929.
- Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2002). A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environ. Microbiol.* 4:770–773.
- Gonzalez-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R., Amils, R. (2003). Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4853–4865.
- Goodfellow, M. (1989). The genus *Rhodococcus* Zopf 1891, p 2362–2371. In Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1st ed, vol 4. *Williams & Wilkins*, Baltimore, MD.
- Goodfellow, M. (1992). The family *Nocardiaceae*, p 1188–1212. In Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Scheifer K-H (ed), *The prokaryotes*. *Springer*, New York, NY.

- Goodfellow, M., Williams, S. T. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37 : 189–216.
- Goodfellow, M., Haynes, J. (1984). Actinomycetes in marine sediments. In Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L. F., Yakoleff, V., Eds. *Academic Press. Elsevier*. New York. pp: 453–472.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B (ed). (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd Edn., vol 5. The Actinobacteria, part A and B. Springer, New York, NY; Dordrecht; Heidelberg; London: Springer.
- Goodfellow, M., Minnikin, D.E.(1985). Chemical methods in bacterial systematics. *Academic Press*, London, United Kingdom.
- Goodfellow, M., O'Donnell, A.G. (1989). Search and discovery of industrially-significant actinomycetes, p 343–383. In Baumberg S, Hunter IS, Rhodes PM (ed), *Microbial products: new approach*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Goodfellow, M., O'Donnell, A.G.(1993). Roots of bacterial systematics. In: Goodfellow M, O'Donnell AG. (Eds) *Handbook of New Bacterial Systematics*; pp. 3-54. *Academic Press Ltd.*, London.
- Goodfellow, M., Simpson, K. E. (1987). Ecology of Streptomycetes. *Front. Appl. Microbiol.* 2, 97–125.
- Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E. and Pang, C. H. N. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the *Nocardin* Strain. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 24: 54–63.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedie J.M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:81–91.
- Govindharaj, Vijayanthi., Ramasamy, Vijayakumar., Dharmadurai, Dhanasekaran. (2016). Actinobacteria — A Biofactory of Novel Enzymes, *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, IntechOpen.
- Grossart, H.P., Schlingloff, A., Bernhard, M., Simon, M., Brinkhoff, T. (2004). Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS. Microbila. Ecol.*; 47(3):387 396.
- Gtari, M., Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Beauchemin, N., and Tisa, L. S. (2012). Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. *Arch. Microbiol.* 194, 3–11.
- Guigue, S. (1947). Les sources thermo minérales de l'Algérie, Etude géochimique, Bulletin du service de la carte géologique de l'Algérie, série 3, volume 2.
- Guigue, S. (1952). Diagrammes logarithmiques de quelques sources thermominérales d'Algérie. pp. 80-96.

**H**

- Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., et al. (2014).** Purification and biochemical characterization of a detergentstable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadurakeratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *J. Biosci. Bioeng.*117: 413–421.
- Hacene, Alayat., Christian, Lamouroux. (2007).** Caractérisation physico-chimique des eaux thermo-minérales des Monts de la Cheffia (extrême Nord-Est Algérien). *Press.Therm. Climat.* 144: 191-199.
- Hall, T. (1999).** BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Han, H., Ling, Z., Khan, A., Virk, A.K., Kulshrestha, S., Li, X. (2019).** Improvements of thermophilic enzymes: from genetic modifications to applications. *Bioresour.Technol* .279:350–361.
- Haouchim F. Z., (1998).** Application of chemical geothermometers springs of the maghreb,
- Harir, M., Miloud, B., Zohra, F., García-Arenzana, J. M., Veloso, A., Rodríguez-Couto, S. (2017).** Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities. *Int. J. Mol. Cell .Med*, 6: 109–120.
- Hasegawa, T., Takizawa, M., Tanida, S. (1983).** A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen .Appl. Microbiol.* 29 : 319–322.
- Hatanaka, T., Usuki, H., Arima, J., Uesugi, Y., Yamamoto, Y., Kumagai, Y., et al. (2011a).** Extracellular production and characterization of two *Streptomyces* Lasparaginases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163: 836–844.
- Hatanaka, T., Yamasato, A., Arima, J., Usuki, H., Yamamoto, Y., and Kumagai, Y. (2011b).** Extracellular production and characterization of *Streptomyces* Xprolyl dipeptidyl aminopeptidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164: 475–486.
- Hayakawa, M., Otaguro, M., Takeuchi, T., et al. (2000).** Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78:171–185.
- Henssen, A. (1957).** Beitrage zur morphologie und systematik der thermophilen actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* 26, 373–414.
- Henssen, A., Schnepf, E. (1967).** Zur Kenntnis thermophiler Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* 57, 214–231.
- Hirsch, A. M., Valdés, M. (2010).** Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:536–542.
- Holmes, A.J., Bowyer, J., Holley, M.P., O'Donoghue, M., Montgomery, M., Gilings, M.R. (2000).** Diverse, yet-to-be-cultured members of the Rubrobacter subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS MicrobiolEcol.* 33:111–120.

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

Hosseini Seyed, Vesal., Zahra, Saffari., Ali, Farhanghi., Seyed, Mohammad Atyabi., Dariush Norouzian.(2016). Kinetics of alkaline protease production by *Streptomyces griseoflavus* PTCC1130, Iran. *J. Microbiol.* 8(1): 8–13.

Hoyles, L., Falsen, E., Foster, G., Rogerson, F., D Collins, M.(2002). *Arcanobacterium hippocoleae* sp. nov., from the vagina of a horse. *Int. J. Syst.Evol.Microbiol.*52:617–619.

Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C. M., Zazopoulos, E., and Bachmann, B. O. (2007). Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem. Biol.* 14, 691–701.

Huang, H., Yao, Y., He, Z., Yang, T., Ma, J., Tian, X., et al. (2011). Antimalarial  $\beta$ -carboline and indolactam alkaloids from *Marinactinospora thermotolerans*, a deep sea isolate. *J. Nat. Prod.* 74: 2122–2127.

Huang, Y., Chen, C., Chen, W., Ciou, Y., Yang, T., and Yang, C. (2013). Production and antioxidant properties of the ferulic acid-rich destarched wheat bran hydrolysate by feruloyl esterases from thermophilic actinomyces. *BioResources*, 8: 4981–4991.

Humble, M.W., A. King and I. Phillips. (1977). API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J. Clin. Pathol.*, 30: 275-277.

Hussein, E.I., Jacob, J.H., Shakhathreh, M.A.K., Al-Razaq, M.A.A., Juhmani, A.F., Cornelison, C.T. (2018). Detection of antibiotic-producing *Actinobacteria* in the sediment and water of Ma'in thermal springs (Jordan). *Germs*, 8(4):191-198.

## I

Ichikawa, N., Oguchi, A., Ikeda, H., Ishikawa, J., Kitani, S., Watanabe, Y., Nakamura, S., Katano, Y., Kishi, E., Sasagawa, M., Ankai, A., Fukui, S., Hashimoto, Y., Kamata, S., Otaguro, M., Tanikawa, S., Nihira, T., Horinouchi, S., Ohnishi, Y., Hayakawa, M., Kuzuyama, T., Arisawa, A., Nomoto, F., Miura, H., Takahashi, Y., Fujita, N. (2010). Genome sequence of *Kitasatospora setae* NBRC 14216T: an evolutionary snapshot of the family *Streptomycetaceae*. *DNA. Res.*, 17:393–406.

Iijima and Ryusuke. (1996). Plant Activator and Mycelial Fertilizer and Method. Yokohama City. US Patent 5529597.

Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Neelson, K.H., Horikoshi, K. (2003). Microbial communities associated with geological horizons in coastal sub seafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12):7224-7235.

Isik, K., Chun, J., Hah, Y., Goodfellow, M. (1999). *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49 : 833–837.

Itoh, T., Yamanoi, K., Kudo, T., Ohkuma, M., Takashina, T. (2011). *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing



Thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1281–1285.

Ivanova, V., Kolarova, M., Aleksieva, K., Gräfe, U., Dahse, H. M., Laatsch, H. (2007). Microbiaeratin, a new natural indole alkaloid from a *Microbispora aerata* strain, isolated from Livingston Island, Antarctica. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 37, 161–168.

Ivanova, V., Laatsch, H., Kolarova, M., and Aleksieva, K. (2013). Structure elucidation of a new natural diketopiperazine from a *Microbispora aerata* strain isolated from Livingston Island, Antarctica, *Nat. Prod. Lett.* 27, 164–170.

Iwamoto, M., Kurachi, M., Nakashima, T., Kim, D., Yamaguchi, K., Oda, T., et al. (2005). Structure–activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. *FEBS Lett.* 579, 4423–4429.

## J

Jani, S. A., Chudasama, C. J., Patel, D. B., Bhatt, P. S., and Patel, H. N. (2012). Optimization of extracellular protease production from alkali thermo tolerant actinomycetes: *Saccharomonospora viridis* SJ-21. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.* 1, 84–92.

Jayashree, S., Vyas, V., Bhatnagar, G. and Syed, S. (1991). On selection of methods and media for isolation of freshwater actinomycetes. *Environ. Technol.* 12 :1183–1186.

Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J., Fenical, W. (2005). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.* 7(7):1039-1048. 30 Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.

Jiang, C., Xu, L. (1993). Actinomycete diversity in unusual habitats. *Actinomycetes*, 4: 47–57.

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

Johnson, D. B., Bacelar-Nicolau, P., Okibe, N., Thomas, A., and Hallberg, K. B. (2009). *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1082–1089.

Johnson, J. L., Anderson, R. S., Ordal, E. J. (1970). Nucleic acid homologies among oxidase-negative *Moraxella* species. *J. Bacteriol.* 101, 568–573.

Johnston, D.W., Cross, T. (1976). The occurrence and distribution of actinomycetes in lakes of the English Lake District. *Freshwater Biol.* 6(5):457-463.

Jorgensen, J.H, Ferraro, M.J . (2009) .Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* 49(11):1749-55.

## K

- Kalakoutskii, L.V., Agre, N.S. (1976). Comparative Aspects of Development and Differentiation in Actinomycetes. *Bacteriol.Rev* n° 2, 40469–524.
- Kämpfer, P. (1998). Some chemotaxonomic and physiological properties of the genus *Sphaerotilus*. *Syst. Appl. Microbiol*, 21: 245-50.
- Kämpfer, P., Kroppenstedt, R.M., Dott, W. (1991). A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 1831 – 1891.
- Kaneko, T., Ohno, T., Ohisa, N. (2005). Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 69, 1073–1081.
- Kang, I. et al. (2012). Genome Sequence of "*Candidatus Aquiluna*" sp. Strain IMCC13023, a Marine Member of the Actinobacteria Isolated from an Arctic Fjord. *Journal of Bacteriology*, 194, 3550–3551.
- Kawato, M., Shinobu, R. (1959). On *Streptomyces herbaricolor* nov.sp. Supplement: A simple technique for the microscopical observation. Mem. Osaka Univ. lib. Arts Educ. 8, 114.
- Khan, S.T., Tamura, T., Takagi, M., Shinya, K. (2010). *Streptomyces tateyamensis* sp. nov., *Streptomyces marinus* sp. Nov. and *Streptomyces haliclona* sp. nov., isolated from the marine sponge *Haliclona* sp. *J.Sys .Evol. Microbiol.* 60 (12): 2775-2779.
- Kikani, B., R.J. Shukla, S.P. Singh. (2010). Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes, in: A. Mendez-Vilas (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Formatex Research Center, Badajoz, Spain,.
- Kilian, M. (1978). Rapid identification of *Actinomycetaceae* and related bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 8: 127-133.
- Kim, B.J, Kim, C.J, Chun, J, Koh, Y.H, Lee, S.H, Hyun, J.W, Cha, C.Y, Kook, Y.H. (2004). Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase beta-subunit gene (rpoB) sequences. *Int. J. Syst. Evol.Microbiol*, 54:593–598.
- Kim, M., Oh H.S., Park S.C., Chun J. (2014).Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J .Syst. Evol. Microbiol*, 64:346-51.
- Kim, S., Kim, D., Cho, SW., Kim, J., Kim, J.S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 24(6):1012-1019.
- Kim, S.B., Lonsdale, J., Seong, C-N., Goodfellow, M. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae. Waksman and Henrici (1943) AL emend. Rainey et al. 1997. *Antonie Van Leeuwenhoek* ,83: 107–116.

- Kim, Y. J., Kim, D. O., Chun, O. K., Shin, D. H., Jung, H., Lee, C. Y., et al. (2005). Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *Thermobifida fusca*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9560–9565.
- Kim, C., Lee, K., Wono, K., Yoo, I., Shimazu, A. (1994). Selective isolation of Actinomycetes by physical pretreatment of soil sample. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 22: 222-225.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Kirby, R. (2011). Chromosome diversity and similarity within the Actinomycetales. *FEMS Microbiol Lett*, 319:1–10.
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioia, 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 the north–east of Algeria. *J. Mycol. Med.* 15: 45-51.
- Kleeberg, I., Welzel, K., VandenHeuvel, J., Müller, R. J., and Deckwer, W. D. (2005). Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. *Biomacromolecules*, 6: 262–270.
- Koch, A. L. (2003). Were Gram-positive rods the first bacteria? *Trends Microbiol.* 11, 166–170.
- Krasilnikov, N. A., Agre, N. S. (1964). On two new species of *Thermopolyspora*. *Hindustan Antibiot. Bull.* 6: 97–107.
- Krishna, P., Arora, A., Reddy, M. S. (2008). An alkaliphilic and xylanolytic strain of actinomycetes *Kocuria* sp. RM1 isolated from extremely alkaline bauxite residue sites. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 3079–3085.
- Krishnakumar, S., Rajan, R., A., and Ravikumar, S. (2011). Extracellular production of L-glutaminase by marine alkalophilic *Streptomyces* sp. SBU1 isolated from Cape Comorin Coast. *Indian J. Mar. Sci.* 40: 717–721.
- Kroppenstedt, R. M. (1992). “The genus *Nocardiopsis*,” in *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, eds A. Balows, H. G. Trusper, W. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (New York, NY: Springer) 1139–1156.
- Kroppenstedt, R. M. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Goodfellow, M., Minnikin, D. E., Eds. *Elsevier Science & Technology Books*. UK. London. PP: 173–199.
- Kumar, S., Dangi, A.K., Shukla, P., Baishya, D., Khare, S.K. (2019). Thermozyms: adaptive strategies and tools for their biotechnological applications. *Bioresour. Technol.* 278:372–382.
- Kumar, V., Bharti, A., Gusain, O., Bisht, G.S. (2010). An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. *J. Sci. Eng. Tech Mgt.* 2: 10-13.

Kumar, Vijay., Bharti, Alpana., Gusain, Omprakash., Singh Bisht, Gajraj. (2011). Scanning Electron Microscopy of *Streptomyces* without use of Any Chemical Fixatives. *Scanning*. 33: 446-449.

Kunisawa, T. (2007). Gene arrangements characteristic of the phylum Actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 359–365.

Kurapova, I., Zenova, G. M., Sudnitsyn, I. I., Kizilova, A. K., Manucharova, N. A., Norovsuren, Z. H., et al. (2012). Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia Desert Steppe Zone. *Microbiology*, 81, 98–108.

Kushner, D.J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, In *Microbial life in extreme environments*. Kushner DJ. (Eds.). London: United Kingdom. *Academic Press*. p. 317–368.

Kutzner, H.J. (1981). The family *Streptomycetaceae* In : Starr, M.P., Stolp, H. Trüper, H.G., Balons, A. Schlegel, H.G. (eds.) : *The Prokaryotes – A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Springer Verlag, Berlin. pp. 2028-2090.

Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O'Neill, J.J., Devine, T.E. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38:358-361.

## Ł

Labeda, D. (1987). Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Dev. Ind. Microbiol*, 28:115–121.

Lacey, J. (1988). *Actinomycetes* as biodeteriogenes pollutants of the environment. In *Actinomycetes in Biotechnology*, Goodfellow, M., Williams, S., Mordarski, M., Eds. *Academic Press*. San Diego. Pp:359–417.

Lahlou Mimi, A., Ben Dhia, H., Bouri, S., Llahrach, A., Ben Abitate, L., Bouchareb-

Lansing, M. Prescott. (2018). *Microbiologie*. Louvane-la-Neuve : De Boeck supérieur, 1120p.

Larpent, J.P., Larpent-Gourgaud, M. (1990). *Momento technique de microbiologie. Tec. & Doc. Lavoisier*.

Larpent, J.P., Sanglier, J.J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson. Paris.

Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. (1965). Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. *Ann Inst Pasteur*, 108:662–673.

Lechevalier, M. P., De Bievre, C., Lechevalier, H. (1977). Chemotaxonomy of aerobic Actinomycetes: Phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol*, 5 :249–260.

Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes, p 225–292. In Dietz A, Thayer DW (ed), *Actinomycetes taxonomy*, vol A6. Virginia Society of Industrial Microbiology, Arlington, VA.

- Lechevalier, M.P, Stern, A.E, Lechevalier, H.A.(1981). Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes, p 111–116. In Schaal KP, Pulverer G (ed), Actinomycetes. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Lechevalier, M.P. (1968) .Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance.*J.Labor.clin.Med* . 71: 934-944.
- Lechevalier, M.P. (1977). Lipids in bacterial taxonomy: a taxonomist's view. *Crit Rev Microbiol* ,5:109 –210.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 20:435–443.
- Lee, L.H., Zainal, N., Azman, A.S., Eng, S.K., Goh, B.H., Yin, W.F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G. (2014). Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated from Tropical Mangrove Sediments in Malaysia .*Sci. World. J.* 2014: 1–14.
- Lengeler, J. W., Drews, G., Schlegel, H. G. (1999).Biology of the Prokaryotes. Stuttgart: Blackwell.
- Letek, M., Ordonez, E., Vaquera, J., Margolin, W., Flärdh, K., Mateos, LM., Gil, JA. (2008). DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol*, 190: 3283–3292.
- Letizia Lo, Grasso., Delia Chillura, Martino., Rosa, Alduina. (2016). Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, IntechOpen.
- Li, Feina., Shaowei Liu., Qinpei Lu., Hongyun Zheng., Ilya A. Osterman., Dmitry A. Lukyanov., Petr V. Sergiev., Olga A. Dontsova., Shuangshuang Liu., Jingjing Ye., Dalin Huang., Chenghang Sun.(2019)."Studies on Antibacterial Activity and Diversity of Cultivable Actinobacteria Isolated from Mangrove Soil in Futian and Maowehai of China", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 11.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C. (2016). Morphological Identification of *Actinobacteria*. In Actinobacteria- Basics and Biotechnological Applications, *InTech*.
- Liang, J., Kang, D., Wang, Y., Yu, Y., Fan, J., Takashi, E. (2015). Carbonate ion-enriched hot spring water promotes skin wound healing in nude rats. *PLoS One*, 10:e0117106.
- Liu, L., Salam, N., Jiao, J. Y., Jiang, H. C., Zhou, E. M., Yin, Y. R., Ming, H. and Li, W. J. (2016). Diversity of culturablethermophilicactinobacteria in hot springs in Tengchong, China and Studies of their Biosynthetic Gene Profiles. *Microb. Ecol*, 72 : 150–162.
- Locci, R. (1979). Micromorphology and development of actinomycetes.Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abteilung, Supplement 11, 119-130.
- Locci, R., Schaal, K. P. (1980).Apical growth in facultative anaerobic actinomycetes as determined by immunofluorescent labelling.Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 1, Originate 246, 112-118.
- Locci, R., Sharples, G.P. Morphology. In: Goodfellow, M., Mordarski, M.M., Williams, S.T. (Eds.). (1984).The Biology of the Actinomycetes. *Academic Press*, London.; PP. 165–199.

López-López, O., Cerdán, M. E., González-Siso, M. I. (2013). Hot Spring Metagenomics. *Life*, 3:308–320.

Lu, Z., Liu, Z., Wang, L., Zhang, Y., Qi, W., and Goodfellow, M. (2001). *Saccharopolyspora flava* sp. nov. and *Saccharopolyspora thermophila* sp. nov., novel actinomycetes from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 319–325.

Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Buss, H.J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whiteman, W.B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria, p 1–28. In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer-Verlag, New York, NY.

Ludwig, W., Klenk, H.P. (2005). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics, p 49–65. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

## M

MacFaddin, J.F. (1980). *Biochemical tests for the identification of medical bacteria*. Second edition. Williams & Wilkins Co. Baltimore, MD.

Madhusudhan, D. N., Mazhari, B. B. Z., Dastager, S. G., Agsar, D. (2014). Production and cytotoxicity of extracellular insoluble and droplets of soluble melanin by *Streptomyces lusitanus* DMZ-3. *Biomed. Res. Int.* 2014:306895.

Makkar, N.S., Cross, T. (1982). *Actinoplanetes* in soil and on plant litter from freshwater habitats. *J. Appl. Bacteriol.*, 52(2):209-218.

Maltsev, I.I., Kalinovskii, A.I., Zgurskaya, H.I., Evtushenko, L.I. (1992). Tyvelose in *Agromyces* cell walls. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15:187–189.

Mane, U.V., Deshmukh, A.M. (2009). Chitin degrading potential of three aquatic actinomycetes and its optimization. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(23):6617–6620.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol. Res.*, 168:311–332.

Mansour, F. A., Mohamedin, A. H. (2001). *Candida albicans* cell wall lytic enzyme produced by *Streptomyces thermodiastaticus*. *Microbios*, 105, 87–101.

Marcone, V., Rocca, G., Lichtner, M., Calzolari, E. (2010). Long-term vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* as a complementary approach to management of bacterial vaginosis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 110 (3):223-226.

Marmann, A.H., Aly, W., Lin, B., Wang, P., Proksch. (2014). Co-cultivation- a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine drugs*, 12:1043-1065.

Martin, J.F. (1992). Clusters of genes for the biosynthesis of antibiotics: Regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *Journal of Industrial Microbiology*, 9: 73–90.

- Martinez, S., Kuhna, M. L., Russell, J. T., Holza, R. C., Elgren, T. E. (2014). Acrylamide production using encapsulated nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* in a sol-gel matrix. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 100: 19–24.
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M. C., Kane, M., Krumins, J. A., Kuske, C. R., Morin, P. J., Naeem, S., Øvreås, L., Reysenbach, A.-L., Smith, V. H., Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:102–112.
- McCarthy, A. J., Cross, T. (1984). A taxonomic study of *Thermomonospora* and other monosporic actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 130, 5–25.
- McCarthy, A. J., Peace, E., Broda, P. (1985). Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 238–244.
- McCorvick, J.R., Flardh, K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS. Microbiol. rev.* 36: 206-31.
- McVeigh, H.P., Munro, J., Embley, T.M. (1996). Molecular evidence for the presence of novel actinomycete lineages in a temperate forest soil. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17:197–204.
- Medouni-Haroune, L., Zaidi, F., Medouni-Adrar, S., et al. (2017). Selective Isolation and Screening of Actinobacteria Strains Producing Lignocellulolytic Enzymes Using Olive Pomace as Substrate. *Iran J Biotechnol*, 15(1):74-77.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H. et al. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14, 60.
- Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.P., Göker, M. (2014). Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 64:352-6.
- Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M., Benammar, L., Benhadj, M., Ayach, i A., Hacène, H., Gonzalez-Paredes, A., Aguilera, M. (2019) Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: a source of promising features and potentialities. *World. J. Microbiol. Biotechnol* , 35:132.
- Méndez, C., Braña, A.F., Manzanal, M.B., Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* 31:446–450.
- Meng, X., Lu, S., Lai, X-H., Wang, Y., Wen, Y., Jin, D., Yang, J., Xu, J. (2017a). *Actinomyces liubingyangii* sp. nov. isolated from the vulture *Gypaetus barbatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67:1873–1879.
- Meng, X., Lu, S., Wang, Y., Lai, X.H., Wen, Y., Jin, D., Yang, J., Bai, X., Zhang, G., Pu, J., Lan, R., Xu, J. (2017b). *Actinomyces vulturis* sp. nov., isolated from *Gyps himalayensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67:1720–1726.
- Meyer, K., Palmer, J. W., Thompson, R., Kharazo, D. (1936). On the mechanism of lysozyme action. *J. Biol. Chem*, 113: 479- 486.

- Miller, L.T. (1982). A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 16:584-586.
- Minotto, E. (2014). Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. PhD. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Minotto, E., Pasqualini, M., Martha., Oliveira, M., Van Der Sand, T. (2014). Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. *Journal of Advanced Scientific Research*; 5:16–23.
- Mitsuiki, S., Takasugi, M., Moriyama, Y., Futagami, T., Goto, M., Kanouchi, H., et al. (2010). Identification of an alkaliphilic actinomycetes that produces a PrPSc-degrading enzyme. *Ann. Microbiol.* 60, 349–353.
- Mohagheghi, A., Grohmann, K., Himmel, M., Leighton, L., Updegraff, D. M. (1986). Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36:435–443.
- Mohammadipanah, F., Wink, J. (2016). Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. *Front. Microb.*, 6:1541.
- Mohseni, M., Norouzi, H., Hamed, J., Roohi, A. (2013). Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the caspian sea. *Int. J. Mol. Cell. Med.*, 2: 64–71.
- Mokrane, S., Bouras, N., Meklat, A., Lahoum, A., Zitouni, A., Verheecke, C., Mathieu, F., Schumann, P., Spröer, C., Sabaou, N., Klenk, H.P. (2017). *Thermoactinomyces khenchelensis* sp. nov., a filamentous bacterium isolated from soil sediment of a terrestrial hot spring. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 109(2):311-7.
- Moody, S.C. (2014). Microbial co-culture : harnessing intermicrobial signaling for the production of novel antimicrobials. *Future Microbiology.* 9(5):575-578.
- Mora-Rosselló, R. (2006). DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In: Stackebrandt E (ed) *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. Springer, Berlin Chap 2
- Müller, R., Wink, J. (2013). Future potential for anti-infectives from bacteria – how to exploit biodiversity and genomic potential. *Int. J. Med. Microbiol.* 304:3–13.
- Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Holt, J.G., Krieg, N.R., Mulder, J.W., Pfenning, N., Sneath, P.H., Stoley, J.T., Williams, S.T (ed). (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 4. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

## N

- Naif Abdullah Al-Dhabi1., Galal Ali Esmail1., Veeramuthu Duraipandiyan ., Mariadhas Valan Arasu., Mounir M., Salem-Bekhit.(2016). Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia. *Extremophiles.* 20:79–90.



Nedjai R., (1987) : Etude hydrologique et hydrochimique des eaux thermales du centre Algérien. Thèse de doctorat, Univ. Grebouble. France.

Nimaichand, S., Devi, A.M., Tamreihao, K., Ningthoujam, D.S., Li, W.J.(2015). Actinobacterial diversity in limestone deposit sites inHundung, Manipur (India) and their antimicrobial activities. *FrontMicrobiol.* 6:413.

Ningthoujam, D. S., Kshetri, P., Sanasam, S., Nimaichand, S. (2009). Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. *World Appl. Sci. J.* 7: 907–916.

Nithya, K., Muthukumar, C., Duraipandiyan, V., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N. (2015).Diversity and antimicrobial potential of culturable *Actinobacteria* from desert soils of Saudi Arabia. *J. Pharm. Sci. Res.* 7(3):117-122.

Norris, P. R., Davis-Belmar, C. S., Brown, C. F., and Calvo-Bado, L. A. (2011). Autotrophic, sulfur-oxidizing *Actinobacteria* in acidic environments. *Extremophiles.* 15, 155–163.

Nurkanto, A., Julisiono, H., Agusta, A., Sjamsuridzal, W. (2012). Screening antimicrobial activity of actinomycetes isolated from Raja Ampat, West Papua, Indonesia. *Makara J Sci.* 16:21–6.

Nyysönen, M.,Tran, H. M., Karaoz, U., Weihe, C., Hadi, M. Z., Martiny, J. B. H., Martiny, A. C. and Brodie, E.L. (2013). Coupled high-throughput functional screening and next generation sequencing for identification ofplant polymer decomposing enzymes in metagenomic libraries. *Front. Microbiol.* 4.

## O

O'Donnell, A.G. (1988). Recognition of novel actinomycetes, p 69–88. In Goodfellow MM, Williams ST, Mordarski M (ed), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, London, United Kingdom.

Ochi, K. (1995). Phylogenetic analysis of mycolic acid-containing wallchemotype IV actinomycetes and allied taxa by partial sequencing of ribosomal protein AT-L30. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:653–660.

Ohta, Y., Ikeda, M. (1978). Deodorization of pig feces by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 487–491.

Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J IndMicrobiol. Biotechnol.* 28 : 56–63.

Oskay A.M., Usame T., Cem A. (2005). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 3(9):441-446.

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

Ottow, J.C.G., 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.

Ouali Ait, A., Issaadi, A., Maizi, D., Ayadi, A., Bouhdjar, A. (2019). Geothermal potential in the Ouarsenis-Biban-Kabylie (North Central Algeria): hot spring catalogue. *Arab J Geosci*, 12:741.

Ouali, S. (1996). ‘Etude géothermique du Sud de l’Algérie’, Mém. Magister, Université M’hamedBouguerra – Boumerdes.

Ouali, S., Mehmah, B., Malek, A. (2007). Etude de faisabilité d’utilisation des eaux thermales de Zelfana Dans la Production d’Hydrogène. ResearchGate.

Ouchari, Lahcen., Amal, Boukeskasse., Brahim, Bouizgarne., Yedir, Ouhdouch. (2019). Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity. *Biol Open* , 8 (2).

Øvreås, L., Torsvik, V. 1998. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microb. Ecol.* 36: 303–315.

## P

Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., and Suh, J. W. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9621–9636.

Pandey, A., Ali, I., Butola, K.S., Chatterji, T., Singh, V. (2011). Isolation and characterization of actinomycetes from soil evaluation of antibacterial activities of actinomycetes against pathogens. *Int. J. Appl. Biol. Pharm .Technol.* 2: 384–92.

Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, I., Ward, A., Horikoshi, K., Bull, A. and Goodfellow, M. (2006). *Williamsiamarianensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Mariana Trench. *Int. J. SystEvolMicrobiol.* 56 : 1123–1126.

Pati, A., Sikorski, J., Nolan, M., Lapidus, A., Copeland, A., Rio, T. G. D., et al. (2009). Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain (P101T). *Stand. Genomic Sci.* 1, 141–149.

Pednekar, P., Jain, R. and Mahajan, G. (2011). Anti-infective potential of hot-spring bacteria. *J Glob. Infect. Dis.* 3:241–245.

Penuliar Gil M., Jann Eldy L., Daquioag,. (2021) .Isolation of Actinomycetes with Cellulolytic and Antimicrobial Activities from Soils Collected from an Urban Green Space in the Philippines. *International Journal of Microbiology*,14.

Phillips, R. W., Wiegel, J., Berry, C. J., Fliermans, C., Peacock, A. D., White, D. C., et al. (2002). *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiationresistant, gram-positive bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 933–938.

Pouget L. et Chouchak D., (1923) : Radioactivité d’eau des sources. Bulletin société d’histoire naturelle d’Afrique du Nord. Département d’Alger. N°14. pp 264-272.

Pouget L. et Chouchak D., (1976) : Radioactivité d’eau des sources. Rev. Esquisse photogéologique de domaine méditerranéen. N°3 : 384-386.

Prauser, H., Lechevalier, M.P., Lechevalier, H. (1970). Description of *Oerskovia* gen. n. to harbor Orskov's motile Nocardia. *Appl. Microbiol.* 19:534.

Prescot L.M., Harley J.P., and Klein D.A.(2007).Microbiologie. Edition De Boeck et Lacier.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2002). VII Ecology and symbiosis. In Microbiology. Fifth edition. The McGraw-Hill.companies, P.596-697.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2010). Microbiologie.De Boek: Bruxelles. 2<sup>ème</sup> édition, p.1088.

Pridham, T.G., Hesseltine, C.W., Benedict, R.G. (1958). A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Appl. Microbiol.* 6:52–79.

Primarini, D., Ohta, Y. (2000).Some enzyme properties of raw starch digesting amylases from *Streptomyces* sp. No. 4. *Starch* 52, 28–32.

Pritchard, D. (2005). Sourcing a chemical succession for cyclosporin from parasites and human pathogens.*Drug Discov.Today.* 10: 688–691.

Priyadharsini, P., D. Dhanasekaran., B. Kanimozhi. (2013). Isolation and structural characterization of N (naphthalene - 1-yl) propanamide, a herbicidal compound from *Streptomyces* sp. KA1-3 Rajesh Kannan Velu (Ed.), Microbiological Research in Agroecosystem Management, Springer India, New Delhi , pp. 187-195.

Prosser, J.I., Tough, A.J., (1991).Growth mechanics and growth kinetics of filamentous microorganisms.*crit. rev. microbial.*

Purushe, S., Prakash, D., Nawani, N. N., Dhakephalkar, P., and Kapadnis, B. (2012).Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture.*Bioresour. Technol.* 115: 2–7.

## Q

Qin, S., Li, J., Chen, H.H., Zhao, G.Z., Zhu, W.Y., Jiang, C.L., Xu, L.H., Li, W.J. (2009) Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol.*75:6176–6186.

Qin, S., Li, W. J., Dastager, S. G., Hozzein, W. N. (2016). Editorial: actinobacteria in special and extreme habitats: diversity, function roles, and environmental adaptations. *Front. Microbiol.* 7:1415.

Qinyuan, Li., Xiu, Chen., Yi, Jiang., Chenglin, Jiang. (2016). Morphological Identification of Actinobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang, IntechOpen,

Quadri, S. R., Agsar, D. (2012). Detection of melanin producing thermoalkaliphilic *Streptomyces* from limestone quarries of the Deccan traps. *World J. Sci. Technol.* 2, 8–12.

**R**

- Rachmania, M.K., Ningsih, F., Setyaningsih, P.P., Syafitri, W.A., Sari, D.C.A.F., Yabe, S., Yokota, A., Oetari, A., Sjamsuridjal, W. (2020). Xylan-degrading ability of thermophilic *Actinobacteria* isolated from soil in a geothermal area. *Biodiversitas*, 21:144-154.
- Radhakrishnan, M., Balaji, S., Balagurunathan, R. (2007). Thermotolerant actinomycetes from Himalayan Mountain- antagonistic potential, characterization and identification of selected strains. *Malaysian Appl. Biol.* 36, 59–65.
- Radhika, S., Bharathi, S., Radhakrishnan, M., Balagurunathan, R. (2011). Bioprospecting of Fresh Water Actinobacteria: Isolation, Antagonistic Potential and Characterization of Selected Isolates. *J. Pharm. Res.* 4:2584–2586
- Rainey, F.A., Klatte, S., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. (1995). *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:32–36.
- Raja, A., Prabakarana, P. (2011). Actinomycetes and drug-an overview. *Am. J. Drug Discov. Develop.* 1, 75–84.
- Ramette, A., Tiedje, J. M. (2007). Multiscale responses of microbial life to spatial distance and environmental heterogeneity in a patchy ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:2761–2766.
- Ramírez MV, Calzadía L. (2016). Industrial enzymes and metabolites from actinobacteria in food and medicine industry. In: Dhanasekaran D, Jiang Y, eds. *Actinobacteria-basics and biotechnological application*. INTECH. World’ s largest Science, Technology & Medicine. 315-328.
- Ravel, J., Amoroso, M. J., Colwell, R. R. and Hill, R. T. (1998). Mercury-resistant actinomycetes from the Chesapeake Bay. *FEMS. Microbiol. Lett.* 162 : 177-184.
- Rawat, S., Johri, B. N. (2013). “Role of thermophilic microflora in composting,” in *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, eds T. Satyanarayana, J. Littlechild, and Y. Kawarabayasi (Heidelberg; Dordrecht; New York, NY; London: Springer), 137–169.
- Ribbe, M., Gadkari, D., Meyer, O. (1997). N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese superoxide oxidoreductase that couple n<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272: 26627–26633.
- Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E.E., Schlicht, M., Colson, S., Muller, M., Joris, B., Koerten, H.K., Hopwood, D.A., Titgemeyer, F., van Wezel, G.P. (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol. Microbiol.* 61:1237–1251.

Ronoh, R. C., Budambula, N. L., Mwirichia, R. K., Boga, H. I. (2013). Isolation and characterization of actinobacteria from Lake Magadi, Kenya. *African. J. Microbiol. Res.* 7 :4200–4206.

Rosselló-Mora, R. (2005). Updating prokaryotic taxonomy. *J. Bacteriol.* 187:6255-7.

Rosselló-Mora, R., Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS. Microbiol. Rev.* 25(1):39-67.

## S

Sabaou, N., H. Boudjella., Achour, Bennadji., Abdellah, Mostefaoui., Abdelghani, Zitouni ., Lynda, Lamari., Hayet, Bennadji., G, Lefebvre., P, Germain.(1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques, *Sécheresse*, vol 9 (2): 147-153.

Sahay, H., Yadav, A.N., Singh, A.K., Singh, S., Kaushik, R., Saxena, A.K. (2017). Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. *3 Biotech.* 7(2):118.

Saibi, H. (2009). Geothermal resources in Algeria. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13:2544-2552.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*; 4:406-425.

Sakiyama, Y, Giang, N.M, Miyadoh, S, Luong, D.T, Hop, D.V, Ando, K. (2014). *Streptomyces catbensis* sp. nov., isolated from soil. *J. Sys.Evol. Microbiol.* 64(6): 2146-2151.

Sasaki, T., Yoshida, J., Itoh, M., Gomi, S., Shomura, T., Shomura, T., et al. (1988). New antibiotics SF2315A and B produced by an *Excelsopora* sp. I. Taxonomy of the strain, isolation and characterization of antibiotics. *J. Antibiot.* 41 : 835–842.

Savornin J., (1913) : les barèges Algériens. *Bull. Soc. Géorg. Alger.*

Schippres, A., Bosecker, K., Willscher, S., Sproer, C., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M. (2002). *Nocardiopsis metallicus* sp. nov., a metal-leaching actinomycetes isolated from an alkaline slag dump. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2291–2295.

Schleifer, K.H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.* 32:533-42.

Schneider, K., Nicholson, G., Strobele, M., Baur, S., Niehaus, J., Fiedler, H.P., Sussmuth, R.D. (2006). The structures of fluostatins C, D and E, novel members of the fluostatin family. *J. Antibiot.* 59(2):105.

Scholler, H. (1962). Les eaux souterraines. Hydrologie dynamique et chimique. Exploitation et évaluation des ressources. Edition Masson. Paris.

Schone, R. (1951). An antibiotic which inhibits *Cornebacterium diphtheriae* produced by S form of *Streptomyces thermophiles*. *Antibiot.Chemother.* 1: 176–180.

- Serrano, W., Amann, R., Rosselló-Mora, R., Fischer, U. (2010). Evaluation of the use of multilocus sequence analysis (MLSA) to resolve taxonomic conflicts within the genus *Mari-chromatium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:116-21.
- Setyaningsih, P.P., Ningsih, F., Rachmania, M.K., Syafitri, W.A., Sari, D.C.A.F., Yabe, S., Yokota, A., Oetari A., Sjamsuridzal, W. (2019). Cellulolytic enzyme-producing thermophilic *Actinobacteria* isolated from the soil of Cisolok Geysers, West Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 20:3134-3141.
- Shirling, E. B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16 (3): 313-340.
- Shivlata, L., Satyanarayana, T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic *Actinobacteria*: biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6:1014.
- Siddique, S., Syed, Q., Adnan, A., Ashraf Qureshi, F. (2014). Isolation, Characterization and Selection of Avermectin-Producing *Streptomyces avermitilis* Strains From Soil Samples. *Jundishapur .J. Microbiol.* 7: e10366.
- Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 341–353.
- Silvestri, L.G., Turri, M., Hill, L.R., Gilardi, E. (1962). A quantitative approach to the systematics of actinomycetes based on overall similarity. *Proc. Symposium of the Society for General Microbiology*, 12: 333- 360.
- Singh, L., Sharma, H., Sahoo, D. (2019) Actinomycetes from Soil of Lachung, a Pristine High Altitude Region of Sikkim Himalaya, Their Antimicrobial Potentiality and Production of Industrially Important Enzymes. *Advances in Microbiology*, 9, 750-773.
- Singh, S. P., Shukla, R. J., Kikani, B. A. (2013). Molecular Diversity and Biotechnological Relevance of Thermophilic *Actinobacteria*. In *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y., Eds. *Springer Netherlands: Dordrecht*. pp.459–479.
- Singh, S.P. Extreme Environments and Extremophiles, in National Science Digital Library (CSIR): E- Book, -*Environmental Microbiology*. CSIR; India. (2006); 1-35.
- Sneath, P., Sokal, R. (1962). Numerical Taxonomy. *Nature*. 193: 855–860.
- Sneath, P.H.A. (1984). Numerical taxonomy. In: Krieg NR, Holt JG. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.1. Baltimore: The Williams & Wikins Co.; pp. 111-118.
- Sneath, P.H.A., (1989). Analysis and Interpretation of Sequence Data for Bacterial Systematics: The View of a Numerical Taxonomist, *Systematic and Applied Microbiology*, 12(1):15-3.
- Sohler, A., Romano A.H, Nickerson W.J. (1958). Biochemistry of the Actinomycetales. III. Cell wall composition and the action of lysozyme upon cells and cell walls of the Actinomycetales. *J. Bacteriol.* 75(3): 283-290.

- Song, Z., Zhi, X., Li, W., Jiang, H., Zhang, C. and Dong, H. (2009). Actinobacterial Diversity in Hot Springs in Tengchong (China), Kamchatka (Russia), and Nevada (USA). *Geomicrobiol J.* 26 : 256–263.
- Stach, J.E., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M. (2004). *Williamsia marissp.* nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(1):191-194.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L.(1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst.Evol. Microbiol.* 47:479–491.
- Stackebrandt, E., Schumann, P. (2006). Introduction to the taxonomy of *Actinobacteria*. *Prokaryotes*. 3:297–321.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-9.
- Stambouli, A.B., Khiat, Z., Flazi, S., Kitamura, Y. (2012) A review on the renewable energy development in Algeria: current perspective, energy scenario and sustainability issues. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16:4445–4460.
- Staneck, J. L., Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thinlayer chromatography. *Appl. Microbiol.* 28 : 226–31.
- Stone, I. M. (1960). Water Dispersible Antibiotics. Staten Island, NY. United States Patent No. 3089818 A.
- Stutzenberger, F. J. (1971). Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. *Appl. Microbiol.* 22: 147–152.
- Suhre, K., Claverie, J. M. (2003). Genomic correlates of hyperthermostability, an update. *J. Biol. Chem.* 278, 17198–17202.
- Suihko, M. L., Kroppenstedt, R. M., and Stackebrandt, E. (2006). Occurrence and characterization of actinobacteria and thermoactinomycetes isolated from pulp and board samples containing recycled fibres. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 183–191.
- Suzuki, K., Goodfellow, M., O'Donnell, A.G. (1993). Cell envelopes and classification, p 195–250. In Goodfellow M, O'Donnell AG (ed), *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Suzuki, K., Nagao, K., Monnai, Y., Yagi, A., and Uyeda, M. (1998). Topostatin, a novel inhibitor of topoisomerases I and II Produced by *Thermomonospora alba* Strain No. 1520 I. taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 51, 991–998.
- Suzuki, K., Yahara, S., Maehata, K., and Uyeda, M. (2001). Isoaurostatin, a novel topoisomerase inhibitor produced by *Thermomonospora alba*. *J. Nat. Prod.* 64, 204–207.

Swarna, Dhavala J., Joel, Gnanadoss. (2020). Screening and Molecular Characterization of Actinomycetes from Mangrove Soil Producing Industrially Important Enzymes. *Journal of Scientific Research*, ;64(2).

Sykes, G., Skinner, F.A.(1973). *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Academic press. London. New York.

## T

Takahashi, K., Totsuka, A., Nakakuki, T., Nakamura, N. (1992). Production and application of a maltogenic amylase by a strain of *Thermomonospora viridis* TF-35. *Starch*. 44: 96–101.

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

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

Tan, H., Deng, Z., Cao, L. (2009). Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Lett. Appl. Microbiol.* 49(2):248-253.

Tanaka, Y., Murata, A., Hayashida, S. (1995). Accelerated composting of cereal shochu-distillery wastes by actinomycetes: promotive composting of Shochu-distillery waster (I). *Seibutsu-kogaku Kais.* 73: 365–372.

Tang, S., Wang, Y., Lee, J., Lou, K., Park, D., Kim, C. and Li, W. (2010). *Georgenialophila sp. nov.*, a halophilic actinobacterium isolated from a salt lake. *Int. J. SystEvolMicrobiol.* 60 : 1317–1421.

Tang, X., Zhou, Y., Zhang, J., Ming, H., Nie, G. X., Yang, L. L., et al. (2012). *Actinokineospora soli sp. nov.*, a thermotolerant actinomycete isolated from soil, and emended description of the genus *Actinokineospora*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1845–1849.

Tang-um, J., Niamsup, H. (2012). Extracellular amylase activity from endophytic *Streptomyces griseoflavus* P4, *Chiang Mai J. Sci.* 39(2): 346-350.

Techapun, C., Charoenrat, T., Poosaran, N., Watanabe, M., and Sasaki, K. (2002). Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces sp.* Ab106. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 431–433.

Thawai, C. (2012). Isolation and characterization of antibiotic-producing actinomycetes from hot spring sediment of Thailand. In International Conference on BioScience: Biotechnology and Biodiversity - Step in the Future. The Fourth Joint UNS - PSU Conference; Terzić, S., Ed., *Institut za Ratarstvo i Povrtarstvo & Semenarska Asocijacija Srbije*, Novi Sad, Serbia. PP:215–219.

Tian, X. P., Tang, S. K., Dong, J. D., Zhang, Y. Q., Xu, L. H., Zhang, S., et al. (2009). *Marinactinospora thermotolerans* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 948–952.



- Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong, K. Nuesslein, T. L. Marsh, and S. J. Flynn. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*. 13:109-122.
- Tindall, B.J. (1990a). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 13, 128-130
- Tindall, B.J. (1990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol. Letts.* 66, 199-202
- Tindall, B.J., Kampfer, P., Euzéby, J.P., Oren, A. (2006). Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2715–2720.
- Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert, R.M., and Kreig, N.R. (2007) Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In *Methods for General and Molecular Microbiology* 3rd edn. Pp. 330-393. Editors: C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak, G. Marzluf, T. M. Schmidt, L. R. Snyder ASM Press, Washington DC, USA
- Tisdall, P. A., Anhalt, J. P. (1979). Rapid differentiation of *Streptomyces* from *Nocardia* by liquid chromatography. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 503-505.
- Tondervik, A., Klinkenberg, G., Aarstad, O. A., Drabløs, F., Ertesvåg, H., Ellingsen, T. E., et al. (2010). Isolation of mutant alginate lyases with cleavage specificity for di-guluronic acid linkages. *J. Biol. Chem.* 285 : 35284–35292.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., and Case, C. L. (2007). *Microbiology: An Introduction*. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings.
- Tresner, H.D., Davies, M.C., Backus, E.J. (1961). Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.* 81:70–80.
- Tseng, M., Hoang, K., Yang, M., Yang, S., and Chu, W. S. (2007). Polyesterdegrading thermophilic actinomycetes isolated from different environment in Taiwan. *Biodegradation* .18, 579–583.
- Tseng, M., Yang, S. F., Hoang, K. C., Liao, H. C., Yuan, G. F., Liao, C. C. (2009). *Actinomadura miaoliensis* sp. nov., a thermotolerant polyester-degrading actinomycetes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 517–520.
- Tyagi, J., Bhatnagar, T., Fanish, P. (2014). Isolation and Characterization of *Actinomycetes* from Soil and Screening Their Antifungal Activities. *Int.J. Life. SciRes.* 2:81–85.

## U

- Usama Ramadan Abdelmohsen., Tanja, Grkovic., Srikanth, Balasubramanian., Mohamed Salah Kamel., Ronald J Quinn., Ute, Hentschel. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnol Adv.* 33(6 Pt 1):798-811.
- Uzel, A., Hameş Kocabaş, E. E., Bedir, E. (2011). Prevalence of *Thermoactinomyces thalophilus* and *T. sacchari* strains with biotechnological potential at hot springs and soils from West Anatolia in Turkey. *Turkish. J. Biol.* 35: 195–202.

## V

Valdes, M., Pérez, N. O., Estrada-de Los Santos, P., Caballero-Mellado, J., Peña-Cabriales, J. J., Normand, P., et al. (2005). Non-Frankia actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 460–466.

Valverde, A., Tuffin, M., Cowan, D. A. (2012). Biogeography of bacterial communities in hot springs: a focus on the actinobacteria. *Extremophiles.*16:669–679.

Van Dissel, D., Claessen, D., van Wezel, G.P. (2014). Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Adv.Appl.Microbiol.* 89:1–45.

Van Wezel, G.P., McDowall, K.J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat. Prod. Rep.* 28:1311–1333.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-38.

Ventura, Marco., Carlos, Canchaya., Andreas, Tauch., Govind, Chandra., Gerald, F. Fitzgerald, Keith F. Chater, Douwe van Sinderen. (2007). *Microbiol.Mol. Biol.Rev.*, 71(3): 495 548.

Venugopalan, V., Tripathi, S. K., Nahar, P., Saradhi, P. P., Das, R. H., Gautam, H. K. (2013). Characterization of canthaxanthin isomers isolated from a new soil *Dietzia* sp. and their antioxidant activities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 237–245.

Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 1–46.

Vítezová, M. (2013). Characterisation of actinomycetes community from the heavy metals-pollute soil. *Acta Univ Agri et Silvi Mende Brun.* 61(5):1471-1478.

Vuataz, F. & Goff, F. (1986) Isotope geochemistry of thermal and nonthermal waters in the Valles caldera, Jemez Mountains, Northern New Mexico. *J. Geophys. Res.* 91.

## W

Waksman, S.A.(1959). Strain specificity and production of antibiotic substances.X. characterization and classification of species within the *Streptomyces griseus* Group. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 45:1043–1047.

Waksman, S.A.(1959). The Actinomycetes Volume 1.Nature, Occurrence and activities, pp.265-276.Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Warwick, S., Bowen, T., McVeigh, H., Embley, T.M. (1994). A phylogenetic analysis of the family *Pseudonocardiaceae* and the genera *Actinokineospora* and *Saccharothrix* with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*. *Int. Syst. Bacteriol.* 44(2):293-9.

- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Tru"per. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463–464.
- Webb, M. D., Ewbank, G., Perkins, J., McCarthy, A. J. (2001). Metabolism of pentachlorophenol by *Saccharomonosporaviridis* strains isolated from mushroom compost. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1903–1914.
- Wellington, E.M., Stackebrandt, E., Sanders, D., Wolstrup, J., Jorgensen, N.O.(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 1943, 339AL. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:156–160.
- Whitaker, R.J., Grogan, D.W., Taylor, J.W. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science.* 301:976–978.
- Wildermuth, H. (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 60:43–50.
- Wildermuth, H., Hopwood, D.A. (1970). Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 60:51–59.
- Wildermuth, H., Wehrli, E., Horne, R.W. (1971). The surface structure of spores and aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. Ultrastruct. Res.* 35(1):168-80.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. (2010). Prescott's microbiology, 7th ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Williams, S. T., Davies, F. L. (1967). Use of a Scanning Electron Microscope for the Examination of *Actinomycetes*. *J.Gen. Microbiol.* 48 : 171–177.
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., Sackin, M.J. (1983). Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Microbiology.* 129 : 1743–1813.
- Williams, S.T., Sharpe, M.E., 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., Sakin, M.J., Mortimer, A.M. (1983). A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *J.Gen.Microbiol.* 129:1815-1830.
- Winter, R. T., Heuts, D. P. H. M., Rijpkema, E. M. A., van Bloois, E., Wijma, H. J., and Fraaije, M. W. (2012). Hot or not? Discovery and characterization of a thermostable alditol oxidase from *Acidothermus cellulolyticus* 11B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 389–403.
- Wu, H., Lian, Y., Liu, B., Ren, Y., Qin, P., and Huang, F. (2014b). *Thermotunica guangxiensis* gen. nov., sp. nov., isolated from mushroom residue compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1593–1599.

## X

- Xiang, X., Morris, N.R.(1999). Hyphal tip growth and nuclear migration. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:636- 40.
- Xiao, Kun., Linda, L. Kinkel., Deborah, A. Samac. (2002). Biological Control of Phytophthora Root Rots on Alfalfa and Soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, 23(3) :285-295.
- Xiao, Y., Zeng, G. M., Yang, Z. H., Mac, Y. H., Huang, C., Xu, Z. Y., et al. (2011). Changes in the *actinomycetale* communities during continuous thermophilic composting as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative PCR. *Bioresour. Technol.* 102, 1383–1388.
- Xu, L., Tiang, Y., Zhang, Y., Zhao, L. and Jiang, C. (1998). *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. *Int J Syst Bacteriol.* 48 : 1089–1093.
- Xu, L.H., Li, W.J., Liu, Z.H., Jiang, C.L. (2007). *Actinomycete Systematics-Principle, Methods and Practice*. 1st ed. Science Press: Beijing.
- Xue, L., Xue, Q., Chen, Q., Lin, C., Shen, G., and Zhao, J. (2013). Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium wilt* of cotton. *Crop Prot.* 43, 231–240.

## Y

- Yamada, Y., Aoki, K., Tahara, Y. (1982). The structure of hexa-hydrogenated isoprenoid sidechain menaquinone with nine isoprene units isolated from *Actinomadura madurae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 28:321–329.
- Yamaki, T., Oikawa, T., Ito, K., and Nakamura, T. (1997). Cloning and sequencing of a nitrile hydratase gene from *Pseudonocardia thermophila* JCM3095. *J. Ferment. Bioeng.* 83 : 474–477.
- Yan, X., Yan, H., Liu, Z., Liu, X., Mo, H., Zhang, L.(2011). *Nocardiopsis yanglingensis* sp. nov., a thermophilic strain isolated from a compost of button mushrooms. *Antonie van Leeuwenhoek.* 100, 415–419.
- Yang, C. H., and Liu, W. H. (2008). Purification and properties of an acetylxylylan esterase from *Thermobifida fusca*. *Enzyme Microb. Technol.* 42:181–186.
- Yang, C. H., Crowley, D. E., Borneman, J., Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Natl Acad Sci.* 98:3889–3894.
- Yokota, A., Tamura, T. (1994). Transfer of *Nocardioides fastidiosa* Collins and Stackebrandt 1989 to the genus *Aeromicrobium* as *Aeromicrobium fastidiosum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:608–611.
- Yong-chao, G., Shu-hai, G., Wang, J., Li, D., Wang, H., Zeng, D.H. (2014). Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere.* 117:486–493.

You, Z. Q., Li, J., Qin, S., Tian, X. P., Wang, F. Z., and Zhang, S. (2013). *Georgenia sediminis* sp. nov., a moderately thermophilic actinobacterium isolated from sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 4243–4247.

## Z

Zarilla, K. A., and Perry, J. J. (1984). *Thermoleophilum album* gen. nov. and sp. nov., a bacterium obligate for thermophily and n-alkane substrates. *Arch. Microbiol.* 137, 286–290.

Zarilla, K. A., and Perry, J. J. (1986). Deoxyribonucleic acid homology and other comparisons among obligately thermophilic hydrocarbonoclastic bacteria, with a proposal for *Thermoleophilum minutum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 13–16.

Zerikly, M., Challis, G.L. (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem.* 10:625–633.

Zhang, W., Zhu, H., Yuan, M., Yao, Q., Tang, R., Lin, M., et al. (2010). *Microbacterium radiodurans* sp. nov., a UV radiation-resistant bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2665–2670.

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.

Zhang, Z., Wang, Y., and Ruan, J. (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetrastora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 : 411–422.

Zhang, Z., Wang, Y., Ruan, J. (1997). A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1048–1054.

Zhi, X.Y, Li, W.J, Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:589–608.

Zhou, E. M., Yang, L. L., Song, Z. Q., Yu, T. T., Nie, G. X., Ming, H., et al. (2012). *Thermocatellispora tengchongensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Streptosporangiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2417–2423.

Zimmerman, W. (1980). Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.* 13:199–130.

Zucchi, T. D., Tan, G. Y. A., Bonda, A. N. V., Frank, S., Kshetrimayum, J. D., and Goodfellow, M. (2012). *Amycolatopsis granulosa* sp. nov., *Amycolatopsis ruanii* sp. nov. and *Amycolatopsis thermalba* sp. nov., thermophilic actinomycetes isolated from arid soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:1245–1251.

## ANNEXES

### Annexe 1

- **Actinomycete Isolation Agar (AIA)**  
Sodium caseinate 2 g  
L-Asparagine 0.1g  
Sodium propionate 4 g  
Dipotassium phosphate 0.5 g  
Magnesium sulphate 0.1g  
Ferrous sulphate 0.001g  
Agar 15g  
pH 8.2
- **Starch Casein Agar (SCA)**  
Amidon soluble 10g  
Caséine 0,3g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g  
KNO<sub>3</sub> 2g  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,05g  
FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,01g  
CaCO<sub>3</sub> 0,02g  
Agar 20g  
pH 7,2
- **Isolation *Streptomyces* Project 2 (ISP2)**  
Extrait d elevure 4g  
Extrait de malt 10g  
Glucose 4g  
Agar 15g  
pH 7,3
- **Bouillon de glycérol**  
Peptone 5g  
Extrait de bœuf 3g  
Glycérol 70ml  
pH 7,6
- **Milieu de culture gélosé Luria-Bertani (LB) modifiées**  
Peptone 5g  
Extrait de levure 3g  
Gomme arabique 2 g

Agar 15 g  
pH7,5

- **Milieu de culture gélosé Luria-Bertani (LB)**

Tryptone 10g  
Extrait de levure 5g  
NaCl 10g  
Agar 15g  
pH 7,5

- **Milieu gélose nutritive**

Peptone 6g  
Extrait de bœuf 1g  
Extrait de levure 2g  
Chlorure de sodium 5g  
Agar 15 g  
pH7,3

- **Milieu Mueller- Hinton**

Extrait de bœuf 2 g  
Hydrolysate de caséine 17,5 g  
Amidon 1,5g  
Agar 17g  
pH 7,3

- **Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)**

Glucose 20g  
Infusion de pomme de terre 200g / Extrait de pomme de terre 4g  
Agar 15g  
pH 5,6

## Annexe 2

Tableau des résultats des différents tests api utilisés sur les souches isolées.

Tests	Souches																						
	A	B	C	C1	C2	C3	D	E1	F	H	H1	I	J	K	K1	L	M	N4	N5	N8.3	N9	N3	N8
<b>api ZYM</b>																							
Alkaline phosphatase	-	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+	++
Esterase (C4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
Esterase lipase (C8)	+	+	+	+	++	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lipase (C14)	+	±	±	-	+	-	+	±	+	±	-	±	+	+	±	±	+	+	±	+	+	-	±
LeucineArylamidase	++	++	++	++	++	±	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
ValineArylamidase	+	++	+	+	+	-	+	±	+	+	+	±	++	+	+	+	+	+	±	+	+	+	±
CystineArylamidase	±	+	-	-	±	-	-	-	±	±	-	-	+	+	-	-	-	+	-	±	±	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-chymotrypsin	-	-	-	-	+	-	++	+	++	-	++	+	+	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
AcidPhosphatase	+	++	+	++	±	±	+	±	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	++	+	+	+	++
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	±	+	+	++	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	++	++	++	++	+	++
α-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±	±	-	-	±
β-galactosidase	++	+	++	+	-	±	+	-	-	±	+	+	++	-	-	-	-	+	+	+	+	++	+
β-glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-glucosidase	++	++	+	-	+	-	±	++	-	±	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-glucosidase	+	++	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-β-glucosaminidase	-	-	++	++	+	-	+	++	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++
α-mannosidase	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	±	+	+	+	±
β-Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-frucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine Dihydrolase	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	-	+	-	-	-	+



Alanyl-Phenylalanyl-- ProlineArylamidase	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Pyroglutamicacidarylamidase	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycyl-tryptophan- Arylamidase	-	++	-	-	+	-	-	±	+	-	+	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	++	-
Hydrolysis of HIPurate	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
Urease	-	+	+	+	+	+	-	++	++	-	-	+	-	++	++	++	++	+	+	++	++	++	+
Pyrazinamidase	+	++	-	-	+	-	+	±	+	-	++	-	-	++	-	+	±	-	-	-	-	-	-
PyrolidonylArylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of Gelatin	+	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduction of Nitrates	-	-	++	++	++	++	-	+	+	-	-	-	-	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Rapid ID 32 STREP</b>																							
ArginineDiHydrolase (ADH)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	-	+	-	-	-	+
βGlucosidase (βGLU)	++	++	-	-	+	-	-	++	++	-	-	-	+	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-
βGalactosidase (βGAR)	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	++	++	+
βGlucuronidase (βGUR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
αGalactosidase (αGAL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±	±	-	-	±
Alkaline Phosphatase (PAL)	-	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+	++	++	+
Ribose (RIB)	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	±	++	+	++	+	++	++	+	+	+	+	+
Mannitol (MAN)	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sorbitol (SOR)	-	-	-	±	-	±	-	±	+	±	+	+	-	+	-	±	-	±	-	-	+	±	-
Lactose (LAC)	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	±	-	±	-	+	-
Trehalose (TRE)	±	-	+	+	-	+	+	-	+	+	++	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Raffinose (RAF)	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	++	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Saccharose (SAC)	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	-	+	-
L-Arabinose (LARA)	-	-	-	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
D-Arabitol (DARL)	-	-	±	+	-	+	±	-	-	+	+	++	±	-	-	-	-	±	-	-	-	±	-
Cyclodextrin (CDEX)	-	-	+	+	-	±	+	-	-	+	+	++	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+



N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase ( $\beta$ NAG)	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ Glucosidase (esculin)(ESC)	++	++	+	-	++	-	-	+	+	-	-	-	++	+	++	+	+	-	-	-	-	+	-	
Urease (URE)	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Hydrolysis of Gelatin (Gel)	+	-	+	+	+	+	++	++	++	+	+	++	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	
Glucose (GLU)	+	+	+	+	+	+	$\pm$	$\pm$	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ribose (RIB)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$\pm$	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Xylose (XYL)	+	+	+	+	+	+	$\pm$	$\pm$	-	+	+	-	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	+	+	+	+	+	
Mannitol (MAN)	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Maltose (MAL)	-	+	+	+	$\pm$	+	-	-	-	-	+	-	$\pm$	-	-	-	+	$\pm$	+	$\pm$	+	+	+	
Lactose (LAC)	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	$\pm$	-	-	-	$\pm$	$\pm$	-	$\pm$	-	+	-	
Saccharose (SAC)	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\pm$	-	$\pm$	-	+	-	
Glycogen (GLYG)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Catalase (CAT)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

(+): positive/présence ; (++): positive/présence importante; ( $\pm$ ): faible (considérer absente); (-): négative/absente

## VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

### ➤ Publications Scientifiques

**Meissa Medjemadj**, Juan-José Escuder-Rodríguez , Allaoueddine Boudemagh , María-Isabel González-Siso.2020. ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM ALGERIAN HOT SPRING WATERS: A POTENTIAL SOURCE OF IMPORTANT ENZYMES. *Eco. Env. & Cons.* 26 (3) : 1145-1157.

Hocinat Amira, Boudemagh Allaoueddine, Ali-Khodja Hocine, **Medjemadj Maissa**. Aerobic degradation of BTEX compounds by *Streptomyces* species isolated from activated sludge and agricultural soils. 2020.*Arch Microbiol.*202(9):2481-2492.

### ➤ Communications scientifiques

**Medjemadj Maissa**. Thermophilic microorganisms and *Actinobacteria* in hot springs. Reasearch seminars.23 Février 2016. Espagne. Présentation orale.

**Medjemadj Maissa**. Diversity of culturable thermophilic *Actinobacteria* in hot springs in East of Algeria. Journées Internationales de Biotechnologie (JIB2016). Du 18 au 22 Décembre 2016. Tunisie. Présentation orale.

**Medjemadj Maissa**. Characterization of actinobacterial species isolated from hot springs using different approaches. International Minisymposium: Metagenomics of thermophiles and thermozyms. 12 Mai 2017. Espagne. Présentation orale.

Lefaida Cherifa, **Medjemadj Maissa**, Boudemagh allaoueddine. Les Actinobactéries thermophiles isolées à partir d'une eau thermale Algérienne : une source d'alpha amylase thermostable. Journées scientifiques nationales sur les enzymes à applications biotechnologiques en Algérie (JSNEABA).Du 20 au 22 Décembre 2020.Présentation affichée.

**Thème :****Etude de la biodiversité des actinobactéries dans quelques eaux thermales de la région Est de l'Algérie****ملخص**

تم استكشاف وجود و التنوع البيولوجي للاكتينوبكتيريا في الينابيع الساخنة المتواجدة في الجزائر.و ذلك بتحليل عينات مياه أربعة ينابيع ساخنة في شمال شرق الجزائر. تم عزل و تحديد 23 سلالة مختلفة شكليا.أظهرت الدراسة التصنيفية من خلال تسلسل الحمض النووي الريبي S16 أن السلالات تنتمي للعائلات *Streptomyetaceae*, *Microbacteriaceae* و *Nocardiaceae* و معظمها ينتسب الى جنس ستربتومييساس.تم استكشاف التنوع الايضي للسلالات أيضا باستخدام معارض (BioMérieux) .api

من مجموعة الأكتينوبكتيريا المعزولة, تم اختيار 4 اكتينوبكتيريا و دراستها بشكل معمق.يتعلق هذا التوصيف بدراسة تصنيفية معتمدة على الخصائص الكيميائية, الفحص المجهرى الإلكتروني الخاص بمرفولوجيا البوغ،القدرة على احتمال مقاييس الاس الهيدروجيني ,تركيزات كلوريد الصوديوم المختلفة و محتوى C+G . وكشفت الدراسة المتعمقة ان هذه السلالات متحملة للحرارة، و تفضل درجة حموضة قلوية. محتوى C+G لهذه السلالات منخفض و يتراوح من 41%الى 66%. جدرانها الخلوية من النوع I و مظهر الأحماض الدهنية الفوسفورية من النوع PII. و الأحماض الدهنية الخلوية المميزة المكتشفة هي: Anteiso-C15:0 , Anteiso-C17:0 , Iso-C16 :0 , Iso-C15:0 , Iso-C17:0.

الميناكينونات الموجودة أساسا هي : MK-9(H6) و MK-9(H8). تحتوي هذه السلالات على العديد من الانزيمات التي تعتبر مثيرة للاهتمام في مجال التكنولوجيا الحيوية مثل السليلاز، الاكسيلانيز، الليبازوالبروتياز.تمت دراسة نشاط المضادات الحيوية لهذه السلالات 4 ضد 6 بكتيريا و 2 فطريات خيطية.هذه الاكتينوبكتيريا المتحملة للحرارة قادرة على انتاج مضادات حيوية ضد بكتيريا الاختبار المدروسة واحدة على الأقل.

**الكلمات المفتاحية:** الينابيع الساخنة، اكتينوبكتيريا، ستربتومييساس، الانشطة الانزيمية، انشطة المضادات الحيوية.

**Membres de jury :**

<b>Président</b>	<b>Mr. BENHIZIA Yacine</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. KITOUNI Mahmoud</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. SILINI Allaoua</b>	<b>MCA</b>	<b>U. Ferhat Abbas Sétif</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. GRAMA Borhane Samir</b>	<b>MCA</b>	<b>U. Larbi Ben M'hidi – O.E.B</b>

*Thème :***Etude de la biodiversité des actinobactéries dans quelques eaux thermales de la région Est de l'Algérie****Résumé**

La présence et la biodiversité des Actinobactéries dans les sources chaudes algériennes a été explorée à partir des échantillons d'eau de quatre sources thermales situées dans le Nord-Est Algérien. vingt-trois isolats morphologiquement distincts ont été isolés et identifiés. L'analyse des séquences d'ARNr 16S a montré que les isolats étaient assignés aux familles Streptomycetaceae, Nocardiaceae et Microbacteriaceae, la majorité étant affiliée au genre *Streptomyces*. La diversité métabolique des souches a été également explorée à l'aide des galeries api® (BioMérieux). Sur le lot d'actinobactéries isolés, 4 actinobactéries ont été sélectionnées et étudiées d'une manière plus approfondie. Cette caractérisation concerne la morphologie des spores par examen microscopique électronique, tolérance aux différents pH et concentrations de chlorure de sodium, la croissance à différentes températures, la teneur en G+C et la chimiotaxonomie. L'étude approfondie a révélé que ces souches sont des bactéries thermophiles facultatives, halotolérantes et préfèrent un pH alcalin. Le contenu de G+C de ces souches est assez faible et varie de 41% à 66%. Leur paroi cellulaire est de type I et leur profil phospholipidique de type PII. Les acides gras cellulaires caractéristiques détectés sont Anteiso-C15:0, Iso-C15:0, Iso-C16:0, Anteiso-C17:0 et Iso-C17:0. Les ménaquinones présents majoritairement sont les MK-9 (H6) et MK-9 (H8). Ces souches possèdent plusieurs enzymes très intéressantes du point de vue biotechnologique comme les cellulases, les xylanases, les lipases et les protéases. L'activité antimicrobienne de ces 4 souches a été effectuée vis-vis de 6 bactéries et 2 champignons filamenteux. Ces actinobactéries thermophiles facultatives sont capables de produire des composés antibiotiques antagonistes contre au moins une bactérie-test étudiée.

**Mots clés :** Eaux thermales, *Actinobacteria*, *Streptomyces*, Activités enzymatiques, Activités antimicrobiennes.

**Membres de jury :**

<b>Président</b>	<b>Mr. BENHIZIA Yacine</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. KITOUNI Mahmoud</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Frères Mentouri Constantine1</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. SILINI Allaoua</b>	<b>MCA</b>	<b>U. Ferhat Abbas Sétif</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mr. GRAMA Borhane Samir</b>	<b>MCA</b>	<b>U. Larbi Ben M'hidi – O.E.B</b>