



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département :** Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Microbiologie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Données théoriques sur les méthodes conventionnelles  
d'isolements et d'identifications des actinobactéries  
originaires de certains écosystèmes.**

---

**Présenté par :** ALLEG Malek

**Le :** 12/06/2024

ADES Ahlem

**Jury d'évaluation :**

**Président :** BOUDEMAGH Allaouddine (Pr - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** MEDJEMADJ Meissa (MAB- U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Examineur :** BOUFERCHA Oumeima (MAB- U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Année universitaire  
2023 - 2024**

## Tables des Matières :

Liste des Figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Remerciement	
Dédicace	
Introduction .....	1
<b>Chapitre I : « Les Actinobactéries »</b>	
1. Historique.....	4
2. Caractéristiques des Actinobactéries .....	4
2.1. La structure cellulaire des Actinobactéries.....	4
2.2. La diversité morphologique et métabolique des Actinobactéries.....	8
2.2.1. La diversité morphologique .....	8
2.2.2. La diversité métabolique des Actinobactéries.....	16
3. Rôle écologique des Actinobactéries .....	17
4. Taxonomie des Actinobactéries .....	19
5. Distribution et habitat des Actinobactéries .....	21
5.1. Environnement Terrestre .....	21
5.2. Environnement aquatique .....	22
5.2.1. Eau douce .....	24
5.2.2. Marine .....	24
6. Autres habitats des Actinobactéries .....	26
7. Application et implication.....	27
7.1. Utilisation des Actinobactéries en biotechnologie .....	27
7.1.1. Production des Antibiotiques .....	28
7.1.2. Production d'Enzymes .....	31
7.1.3. Production de Sidérophores .....	32
7.1.4. Production des vitamines .....	33
7.2. Importance des actinobactéries médical (la biotechnologie rouge) et pharmaceutique .....	33
7.2.1. Agents Antifongiques.....	33
7.2.2. Agents antiviraux .....	34

7.2.3.	Agents Antitumoraux .....	34
7.3.	Impact des Actinobactéries sur la préservation de l'environnement .....	35
<b>Chapitre II : « Approche conventionnelles d'isolement des actinobactéries »</b>		
1.	Approche conventionnelles d'isolement des actinobactéries.....	37
1.1.	Prélèvement des échantillons à partir des différents habitats .....	38
1.2.	Prétraitement des échantillons d'essai .....	38
1.3.	Méthodes d'isolement des actinobactéries de différents habitats .....	41
1.3.1.	Isolement des actinobactéries thermophiles .....	41
1.3.2.	Isolement des actinobactéries halophiles et alcalophiles .....	42
1.3.3.	Isolement des actinobactéries acidophiles.....	42
1.3.4.	Isolement des actinobactéries endophytes végétales.....	42
1.3.5.	Isolement des actinobactéries à partir des excréments d'animaux.....	43
1.3.6.	Isolement des actinobactéries associées aux lichens .....	44
1.3.7.	Isolement des actinobactéries rares .....	44
<b>Chapitre III : « Méthodes d'identification préliminaires des Actinobactéries »</b>		
1.	Méthodes d'identification préliminaires des Actinobactéries .....	48
1.1.	La description des colonies et la formation du pigment mélanoides.....	48
1.1.1.	Croissance (G).....	48
1.1.2.	Couleur inversée (R) .....	48
1.1.3.	Mycélium aérien (A) .....	48
1.1.4.	Pigment Soluble (S) .....	48
2.	Tests physiologiques .....	49
2.1.	Résistance au chlorure de sodium (Kutzner 1981).....	49
2.2.	Résistance au lysozyme (Kutzner 1981) .....	49
2.3.	Teneur en pH (Kutzner 1981).....	50
2.4.	Utilisation des hydrates de Carbon.....	50
2.5.	Empreintes physiologiques avec les bandes api .....	50
2.6.	La plaque Bio log .....	54
2.7.	Fiche technique de la souche .....	55
3.	Caractérisation au microscope optique .....	57
4.	Microscopie électronique à balayage.....	58
	Discussion générale.....	60
	Conclusion et perspective.....	63
Les Annexes		
Références Bibliographiques		

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire trouvée dans des membres de l'ordre des Corynebacterales. Les composants ont été mis à l'échelle à l'aide des résultats obtenus par CEMOVIS pour <i>M. bovis</i> BCG.....	6
<b>Figure 2</b> : Protéines du cytosquelette contribuant à la croissance apicale de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	7
<b>Figure 3</b> : Organisations flagellées de spores actinobactérienne. a) monotrichous monopolaires, b) pérित्रichouses, c) polytrichouses, d) polytrichouses monopoles (lophotrichos), e) polytrichoides subpolaires et f) polytrichoides latéraux.....	8
<b>Figure 4</b> : Cycle de vie des Actinobactéries sporulant.....	9
<b>Figure 5</b> : Exemples de fragmentation du mycélium de substrat de A. <i>Nocardia asteroides</i> , B. <i>Actinosynnema mirum</i> et C. <i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> .....	10
<b>Figure 6</b> : Actinobactéries colonie se développant sur gélose (morphologie commune des Actinobactéries, la section transversale d'une colonie d'actinomycètes montrant le substrat mycélium et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores).....	12
<b>Figure 7</b> : Micrographies des spores du genre <i>Streptomyces</i> prises avec le microscope électronique à balayage. 1. lisse, 2. Épineuse, 3. Poilue, 4. Verruqueuse, 5. Rugueuse, 6. épineuse.....	13
<b>Figure 8</b> : Micrographie de type de flagellation. A. <i>Kineococcus radiotolerans</i> , B. <i>Catenuloplanes</i> et C. <i>Actinoplanes regularis</i> .....	13
<b>Figure 9</b> : Micrographies des chaînes de spores d'A. <i>Streptomyces otagonensis</i> SANK 62589, B. <i>Streptomyces</i> sp. OM-6519, C. <i>Actinomadura rugatobispora</i> AS 6321, D. <i>Actinomadura</i> sp. ATCC 53676, E. <i>Streptomyces routienii</i> ATCC 39466, F. <i>Actinomadura verrucosospora</i> JCM 31.....	14
<b>Figure 10</b> : Forme des sporanges chez quelques actinobactéries. A : <i>Pilimelin</i> , <i>Actinoplanes</i> et <i>Streptosporangium</i> , B : <i>Planomonospora</i> et <i>Planobispora</i> .....	15
<b>Figure 11</b> : Disposition du mycélium étudiée par microscopie à contraste de phase de neuf souches à gauche, et morphologie des sporophores étudiées en microscopie électronique à balayage de neuf souches à droite.....	16
<b>Figure 12</b> : Arbre phylogénétique basé sur le génome basé sur 97 séquences génomiques du Phylum <i>Actinobacteria</i> .....	20

<b>Figure 13</b> : Écologie des Actinomycètes. Les Actinomycètes libres sont omniprésents dans les écosystèmes du sol, ainsi que dans les écosystèmes marins et d'eau douce .....	22
<b>Figure 14</b> : Différents types d'enzymes produites par Actinobactérie. a. Amylase. b. Protéase. c. Lipase. La zone D'inhibition autour des Actinobactéries inoculées confirme la production d'enzyme particulière .....	32
<b>Figure 15</b> : Influence du traitement par ondes ultrasonores par l'UFC entre les actinomycètes et d'autres bactéries. Unités de formation de colonies d'UFC .....	40
<b>Figure 16</b> : Le code de la couleur RAL.....	49
<b>Figure 17</b> : la galerie api coryne .....	51
<b>Figure 18</b> : la galerie api Zym .....	52
<b>Figure 19</b> : La galerie api 20 .....	53
<b>Figure 20</b> : la Micro Plates d'identification GP2 .....	55
<b>Figure 21</b> : Chaîne de spores en spirale d'Actinomadura namibiensis, grossissement x 350 Microscopie électronique à balayage. ....	57
<b>Figure 22</b> : Microscopie électronique à balayage.....	58
<b>Figure 23</b> Quelques exemples de chaînes de spores, de sporanges et de spores uniques en microscopie électronique à balayage (MEB) de différentes actinomycétales.....	58

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : La distribution de quelque genre des Actinobactéries dans la nature .....	22
<b>Tableau 2</b> : Actinobactéries isolés de divers habitats écologiques.....	26
<b>Tableau 3</b> : Antibiotiques courants synthétisés par les Streptomyces.....	29
<b>Tableau 4</b> : importance médicale de certains antibiotiques produits par le genre <i>Streptomyces</i> et leurs maladies ciblée .....	30
<b>Tableau 5</b> : Prétraitements thermiques sélectifs pour l'isolement des actinobactéries.....	39
<b>Tableau 6</b> : Prétraitement chimique pour l'isolement des actinobactéries .....	41
<b>Tableau 7</b> : Produits chimiques sélectifs pour l'isolement des actinobactéries rares .....	45
<b>Tableau 8</b> : Produits chimiques sélectifs pour l'isolement des actinobactéries rares ( <b>suite</b> tableau 7).....	46
<b>Tableau 9</b> : Méthodes de combinaison pour l'isolement d'actinobactéries rares .....	46
<b>Tableau 10</b> : Les tests de la galerie api coryne.....	51
<b>Tableau 11</b> : les enzymes testés de la galerie api Zym .....	52
<b>Tableau 12</b> : Les tests de la galerie api 20 .....	53

## Liste des abréviations

**PG** : peptidoglycane

**La couche S** : la couche de surface

**BMCs** : les Microcomposants bactériens

**PHA** : polyhydroxyalcanoïque

***M. tuberculosis***: *Mycobacterium tuberculosis*

***M. kansasii***: *Mycobacterium kansasii*

***M. leprae*** : *Mycobacterium leprae*

**MEB** : microscopie électronique à balayage

**TEM** : microscope Electronique de transmission

**PGP** : promotion de la croissance des plantes

**DPTD21** : *Streptomyces noursei*

**CC17** : *Streptocoque hypervirulent*

**PGPR** : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine (Sida)

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**MSD** : Merck Sharp et Dohme (société pharmaceutique américaine)

**pH** : potentiel hydrogène

**UFC** : unité formant colonie

**La galerie API** : Appareils et Procédés d'Identification

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**MA** : mycélium aérien

**MS** : mycélium du substrat

## ملخص

الاكتينوبيكتيريا هي مجموعة من البكتيريا إيجابية الجرام، ولها نسبة عالية من GC، وتتميز بمورفولوجيتها الخيطية وقدرتها على إنتاج مجموعة متنوعة من المستقلبات النشطة بيولوجيا. تطورت الاكتينوبيكتيريا التي تم اكتشافها في القرن التاسع عشر، عبر فترات مختلفة، من التركيز على الكائنات المسببة للأمراض إلى إدخال الأساليب الوراثية في الستينيات، مما أحدث ثورة في تصنيفها واستخدامها في مجال التكنولوجيا الحيوية. لقد تناولنا في عملنا عدة نقاط منها: خاصية وتنوع البكتيريا الشعوية حيث أنها تمتلك بنية خلوية معقدة ذات تنوع مورفولوجي واستقلابي واسع جداً، بالإضافة إلى دورها الهام في البيئة. تم العثور على الاكتينوبيكتيريا في مجموعة واسعة من الموائل، بما في ذلك التربة والمياه العذبة والبحرية، فضلا عن البيئات القاسية مثل التربة القاحلة والينابيع الساخنة، وحتى الكائنات الحية التكافلية. وتستخدم هذه في العديد من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية، بما في ذلك إنتاج المضادات الحيوية، والإنزيمات الصناعية، والأدوية، وكذلك في تحليل المركبات العضوية والتحويل الحيوي للركائز. في هذا العمل، تم تناول طرق العزل الكلاسيكية بالإضافة إلى خطوات تحديد البكتيريا الشعاعية، وتوفر هذه الأساليب نهجاً بسيطاً واقتصادياً، ولكنها قد تمثل قيوداً من حيث الانتقائية واستعادة الأنواع الأقل وفرة أو صعوبة في الزراعة. في الختام، على الرغم من استخدام أساليب العزلة الكلاسيكية للبكتيريا الأكتينوبيكتيريا على نطاق واسع، إلا أنه يمكن تحسين كفاءتها من خلال دمج تقنيات الزراعة والتوصيف الحديثة لتحسين تمثيل واستغلال تنوع هذه الكائنات الحية الدقيقة

**الكلمات المفتاحية:** الاكتينوبيكتيريا، الطرق التقليدية، الوسائط الانتقائية، طرق التعريف

## Résumé

Les Actinobactéries sont un groupe de bactéries à Gram positif, possédant un pourcentage GC élevé, caractérisées par leur morphologie filamenteuse et leur capacité à produire une variété de métabolites bioactifs. Les Actinobactéries, découvertes au 19<sup>e</sup> siècle, ont évolué à travers différentes périodes, depuis une concentration sur les organismes pathogènes jusqu'à l'introduction de méthodes génétiques dans les années 1960, bouleversant ainsi leur classification et leur utilisation biotechnologique. Dans notre travail, nous avons abordé plusieurs points notamment : caractéristique et diversité des Actinobactéries. Les Actinobactéries se retrouvent dans une grande diversité d'habitats, incluant les sols, les eaux douces et marines, ainsi que les environnements extrêmes tels que les sols arides, les sources chaudes, et même les organismes symbiotiques. Ces dernières sont utilisées dans une multitude d'applications biotechnologiques, notamment dans la production d'antibiotiques, d'enzymes industrielles, de médicaments, ainsi que dans la dégradation de composés organiques et la bioconversion de substrats. Dans ce travail, les méthodes classiques d'isolement ont été abordées ainsi que les étapes d'identification des Actinobactéries, ces méthodes offrent une approche simple et économique, mais peuvent présenter des limitations en termes de sélectivité et de récupération des espèces moins abondantes ou difficiles à cultiver. En conclusion, bien que les méthodes d'isolement classiques des Actinobactéries soient largement utilisées, leur efficacité peut être améliorée par l'intégration de techniques modernes de culture et de caractérisation pour une meilleure représentation et exploitation de la diversité de ces microorganismes.

**Mots clés :** *Actinobacteria*, approches conventionnelles, milieux sélectifs, méthodes d'identification.

## **Abstract**

Actinobacteria are a group of Gram-positive bacteria, have a high GC percentage, characterized by their filamentous morphology and their ability to produce a variety of bioactive metabolites. Actinobacteria, discovered in the 19th century, evolved through different periods, from a focus on pathogenic organisms to the introduction of genetic methods in the 1960s, revolutionizing their classification and biotechnological use. In our work, we have addressed several points including: characteristic and diversity of Actinobacteria as it has a complex cellular structure with a very vast morphological and metabolic diversity, in addition to its important role in the environment. Actinobacteria are found in a wide variety of habitats, including soils, fresh and marine waters, as well as extreme environments such as arid soils, hot springs, and even symbiotic organisms. These are used in a multitude of biotechnological applications, including in the production of antibiotics, industrial enzymes, drugs, as well as in the degradation of organic compounds and the bioconversion of substrates. In this work, classic isolation methods were addressed as well as the steps for identifying Actinobacteria, these methods offer a simple and economical approach, but may present limitations in terms of selectivity and recovery of less abundant or difficult species to cultivate. In conclusion, although classical isolation methods for Actinobacteria are widely used, their efficiency can be improved by the integration of modern cultivation and characterization techniques for better representation and exploitation of the diversity of these microorganisms.

**Key words:** *Actinobacteria*, conventional methods, selective media, identification methods.

# *Remerciement*

Avant tout, nous exprimons notre gratitude à **Allah**, qui nous a donné le courage, la volonté, la force, la santé et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce travail. Nous le remercions de nous avoir guidés vers la réussite malgré les obstacles rencontrés.

Nous tenons à adresser nos plus sincères remerciements à **Mme MEDJEMADJ Maïssa**, maître assistant à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Frère Mentouri, pour nous avoir proposé ce sujet. Son encadrement, ses encouragements, ses orientations critiques, sa patience, ses conseils scientifiques avisés, sa compétence et sa bienveillance ont été déterminants dans la réalisation de ce mémoire.

Nous souhaitons également remercier les membres du jury, le Professeur **Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine** et le Docteur **M<sup>lle</sup> BOUFERCHA Omeïma** pour avoir accepté d'évaluer notre travail et pour leurs remarques constructives qui ont contribué à l'amélioration de ce mémoire.

Nos remerciements vont également à l'ensemble du corps professoral et administratif de notre université pour leur aide précieuse et leur disponibilité tout au long de notre parcours académique.

Ce mémoire est le fruit de multiples contributions, et nous sommes profondément reconnaissants envers toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, participé à cette aventure académique.

*Merci à tous.*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à mon père bien-aimé **Mohammed**, mon modèle et l'amour de ma vie, tu m'as quittée trop tôt. J'aurais tant souhaité que tu partages mes moments de réussite, mais le destin en a décidé autrement. Je resterai toujours ta fille forte, ambitieuse et accomplie. Je t'ai fait une promesse et je l'ai tenue, et je continuerai sur cette voie. Que Dieu te bénisse et t'accorde une place dans son vaste paradis. Tu me manque tellement dans mon cœur papi repose en paix, mon cher.*

*À ma chère mère **Soraya**, je n'ai pas de mots pour te décrire, toi qui es le printemps de notre maison et la lumière de ma vie. Maman, ma confidente et le joyau de mon existence, je te dédie cette réussite en témoignage de gratitude pour tous les sacrifices que tu as faits et que tu continues de faire. Que Dieu te garde, toi qui es la couronne sur ma tête.*

*À mon frère chéri **Wassim** et à ma douce petite sœur **Loudjain**, je vous aime tellement.*

*À mon futur mari **Rahim**, mon soutien indéfectible, que dieu te garde et je prie pour que notre union soit longue et heureuse. Tu es mon pilier secret dans mes difficultés que dieu te protège, vraiment tu es la plus belle coïncidence de ma vie.*

*À la famille **Alleg** et **Bouzahzah**, et surtout mes chers grands parents mes grands-mères **Khadidja** et **Zouleikha** en particulier à mes chers grand-père **Athman** et **Saleh**, paix à leurs âmes, à mes chères tantes maternelle **Chahrazed**, **Souzan**, **Samah**, **Nedjma**, et à mon oncle maternel exceptionnel **Salem**, je t'aime de tout mon cœur oncle.*

*À ma deuxième famille **Gridi**, en particulier papa **Amar** et à tata **Fatiha** et à ma grande sœur **Besma**.*

*A ma plus belle binôme et amie **Ahlem**, qui a partagé avec nous des souvenirs.*

*Malek*

# Dédicaces

Avant tous Je remercie **Allah** pour m'avoir donné le courage et de m'avoir aidé à surmonter tous les obstacles pour mener ce travail à terme.

Je dédie ce travail

A mon cher père **Houcine**, à qui je dois ce que suis devenue aujourd'hui, qu'**Allah** lui accorde son vaste paradis.

Je regrette qu'il ne soit plus là pour me fêter.

Regarde papa j'y suis presque, j'espère que tu es fière de moi.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie, ma mère **Malika** que j'aime.

À tous les membres de ma famille, Ades et Dermime,

À mes chères sœurs, **Roumaissa, Aziza, Zineb**, qui m'ont toujours encouragé à exceller et à réussir, que vous restiez toujours bienveillantes.

À mes frères, **Billel et Mohamed El Hadi**, qui ont été un soutien pour moi après le départ de mon père, qu'**Allah** vous garde comme un soutien pour moi.

À ma partenaire et mon amie, **Malak**, avec qui j'ai toujours partagé chaque difficulté et surmonté tous les obstacles pour accomplir ce travail, qu'**Allah** vous guide et vous soutienne. À mes chères amies, **Kenza, Ikram, Iness, Roufaïda, Marwa**, qui m'ont toujours soutenue, qu'**Allah** vous protège et vous guide dans vos vies.

À tous ceux qui m'ont aimé et m'ont soutenu dans mon parcours, que ce soit de près ou de loin.

Ahlem

# « Introduction »

## Introduction

Les Actinobactéries sont un groupe de micro-organismes Gram-positifs, ubiquitaires. Elles jouent un rôle crucial dans les écosystèmes grâce à leurs capacités métaboliques variées, notamment la dégradation de matières organiques complexes comme la cellulose, la chitine et la lignine, contribuant ainsi au recyclage des nutriments dans l'environnement (**Cross, 1974**). De plus, les Actinobactéries sont bien connues pour leur capacité à produire une gamme diversifiée de métabolites bioactifs, y compris des antibiotiques, des enzymes et d'autres composés pharmaceutiques, ce qui leur confère une importance biotechnologique significative (**Dietz et Mathews, 1970**). L'isolement des Actinobactéries est une étape fondamentale pour leur identification et leur étude. Les méthodes classiques d'isolement incluent la culture sur milieu sélectif, la dilution en série, le prétraitement des échantillons, ainsi que la filtration et la centrifugation. Ces méthodes ont été développées pour permettre l'isolement de souches spécifiques à partir de divers environnements et pour maximiser la pureté et la diversité des cultures obtenues (**Dietz et Mathews, 1970**).

L'étude des méthodes d'isolement des Actinobactéries vise à optimiser la récupération et la culture de ces micro-organismes à partir de divers environnements pour plusieurs raisons essentielles comme l'exploration de la diversité microbienne ; parce que les Actinobactéries sont omniprésentes dans différents habitats, y compris les sols, les eaux douces, les milieux marins et même les environnements extrêmes et étudier et isoler ces micro-organismes permet de mieux comprendre la diversité microbienne et les rôles écologiques qu'ils jouent dans ces écosystèmes, et même aussi pour la compréhension écologique et biodiversité .

Et elles sont une source prolifique de métabolites bioactifs, par exemple, la découverte de la streptomycine et d'autres antibiotiques issus de *Streptomyces* a révolutionné la médecine moderne (**Dietz et Mathews, 1970**). Et leur importance dans les applications industrielles, l'agriculture, la biorestauration et la fabrication de produits chimiques et la raison essentielle, c'est le développement de techniques d'isolement efficaces et l'optimisation des méthodes de culture puisque, plusieurs espèces d'Actinobactéries peuvent nécessiter des conditions de culture spécifiques.

Il est possible de découvrir et d'identifier de nouvelles espèces d'Actinobactéries, enrichissant ainsi la base de connaissances scientifiques et ouvrant la voie à de nouvelles applications biotechnologiques (**Dietz et Mathews, 1970**), ainsi que la préservation de la

diversité puisqu'il est crucial de minimiser les biais introduits par les techniques d'isolement qui pourraient favoriser certaines espèces au détriment d'autres, assurant ainsi une représentation plus complète de la diversité naturelle des Actinobactéries dans les échantillons environnementaux. **(Dietz et Mathews, 1970).**

L'objectif de ce travail, est de développer les différentes méthodes d'isolement et de culture qui maximisent la récupération des Actinobactéries tout en minimisant la croissance des contaminants, et aussi de mettre en évidence les principales étapes adoptées par les chercheurs qui mènent à l'identification des isolats des Actinobactéries.

# **Chapitre 1 : « Les Actinobactéries »**

## 1. Historique

Les Actinobactéries ont une histoire riche qui remonte à leur découverte au 19<sup>e</sup> siècle. Les périodes de découverte, de caractérisation, de nomenclature et d'utilisation des Actinobactéries sont : La première période (1874-1900), également connue sous le nom de période médicale, s'est concentrée uniquement sur les organismes pathogènes et leur impact sur les maladies. La découverte du premier Actinobactéries *Streptothrix foeresteri* par Cohn en 1875 a marqué le début de cette période (**Anibou, 2008**). La période suivante (1900-1940) est marquée par l'identification des conditions saprophytiques d'habitat des Actinobactéries et les premières expériences visant à distinguer les groupes pathogènes et saprophytiques (**Baldacci, 1962**).

En 1943, les antibiotiques produits par les Actinobactéries ont été découverts pour la troisième période. Au cours de cette période, le nombre d'espèces a augmenté, les brevets des spécialités antibiotiques ont été émis et les règlements gouvernent les nouvelles espèces (**Baldacci, 1962**). En 1943, Waksman et Henrici inventent le genre *Streptomyces*, qui regroupe les Actinobactéries dont le mycélium aérien génère des chaînes de spores transportées par des sporophores. En 1944, découverte de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (**Le Minor et al., 1989 ; Sanglier et Trujillo, 1997**).

La quatrième période (1940-1970) commence par la découverte que différentes Actinobactéries peuvent produire le même antibiotique. Durant cette période, on observe une révision des travaux réalisés et des règles de nomenclature. C'est donc la période où les critères morphologiques et biochimiques sont développés pour classer les Actinobactéries. L'utilisation des méthodes génétiques est le point de départ de la cinquième période qui commence dans les années 1960 avec Hopwood (**Chater, 1999 ; Hopwood, 1973**). La génomique (**Hopwood, 2003**) a bouleversé la classification des espèces (**Ventura et al., 2007**) et d'étude de l'utilisation biotechnologique de ces microorganismes.

## 2. Caractéristiques des Actinobactéries

### 2.1. La structure cellulaire des Actinobactéries

La structure cellulaire des Actinobactéries est particulièrement complexe et présente des propriétés distinctives (**Figure 1**). Les Actinobactéries sont des micro-organismes ramifiés unicellulaires qui se développent habituellement en mycélium. Leur structure contient plusieurs compartiments comme l'enveloppe cellulaire, cytoplasme...

On peut considérer l'enveloppe cellulaire bactérienne comme la ou les membranes et autres structures qui entourent et protègent le cytoplasme de la bactérie de manière acceptable. Cette structure multicouche est assez complexe et joue un rôle important dans la vie et la survie de l'organisme grâce à des mécanismes sophistiqués (**Silhavy et al., 2010**).

Outre l'identification de la forme et de la perméabilité des cellules, l'enveloppe cellulaire des Actinobactéries joue un rôle d'interface pour interagir avec d'autres bactéries, l'environnement et l'hôte si elle est pathogène. Ainsi, l'étude de ce compartiment est d'une grande importance, en particulier en médecine et dans les processus biotechnologiques (**Braun et al., 2015**). De plus, la chimio taxonomie qui s'avère être une stratégie efficace pour la classification des Actinobactéries concerne la distribution de produits chimiques spécifiques de l'enveloppe cellulaire d'Actinobactéries tels que les acides aminés, le sucre, les lipides polaires, les ménaquinones, les mycoliques et les acides gras (**Diagne et al., 2013**).

En général, on se concentre sur l'étude de l'enveloppe cellulaire actinobactérienne pour les membres pathogènes les plus importants, comme la famille distinctive de *Corynebacteriaceae*, qui comprend principalement *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Nocardia*.

La membrane plasmidique de ce groupe des bactéries mentionnées n'est pas significativement distincte des autres. Dans cette membrane plasmidique, un lipide inhabituel appelé diacylphosphatidylinositol-dimannoside est rapporté pour être le composant dominant de la couche interne dans *Mycobacteria*, il est prouvé qu'il est à l'origine de la résistance générale aux médicaments dans ce genre en raison de son effet sur la fluidité de la membrane, qui ralentit l'afflux des médicaments (**Bansal-Mutalik et Nikaido, 2014**).

En plus de la membrane plasmidique conventionnelle qui ne diffère pas d'autres bactéries (comprenant principalement le phosphatidylglycerol), les *Corynebacteriaceae* ont une couche extérieure de lipides entourant la paroi cellulaire qui est différente de la membrane intérieure, comme la membrane des bactéries à coloration de Gram négative. En conséquence, cette caractéristique inhabituelle des bactéries à coloration de gram positive confère aux *Corynebacteriaceae* une barrière supplémentaire de perméabilité extérieure. Cette membrane extérieure est une bicouche asymétrique qui est environ deux fois plus épaisse que la membrane plasmidique dans les *Corynebacteriaceae* (**Brennan et Nikaido, 1995**), bien que les corynébactéries manquent de l'espace périplasmique qui est présent dans les *Mycobacteria*.

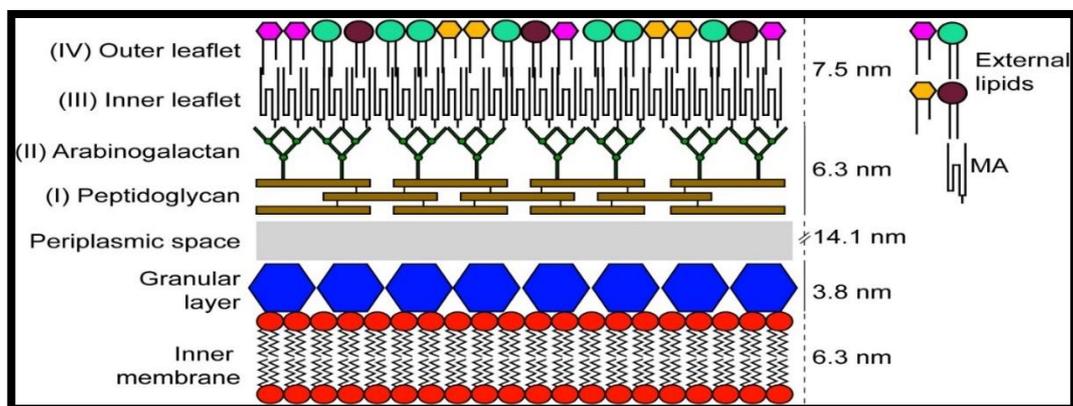
L'enveloppe cellulaire contient également la paroi cellulaire, ce dernier est composé d'une couche de peptidoglycane (PG) d'une épaisseur comprise entre 20 et 80 nm. La paroi

cellulaire représente vingt pour cent du poids sec de la cellule, dont environ soixante pour cent est le poids du PG. Le reste du poids est dû à la présence de diverses macromolécules telles que des lipides, des polysaccharides, des protéines et des acides techoïques, dont certains sont libres tandis que d'autres sont attachés au PG. Outre la paroi il y a la couche de surface et capsule, La couche de surface ou (S-layer) est une couche cristalline monomoléculaire extérieure de la couche de l'enveloppe cellulaire composée de protéines ou de glycoprotéines identiques trouvées dans l'enveloppe de cellules de divers groupes taxonomiques bactériens ainsi que dans certains membres d'Actinobactéries.

Les cellules équipées de la couche S peuvent résister efficacement à la pression osmotique.

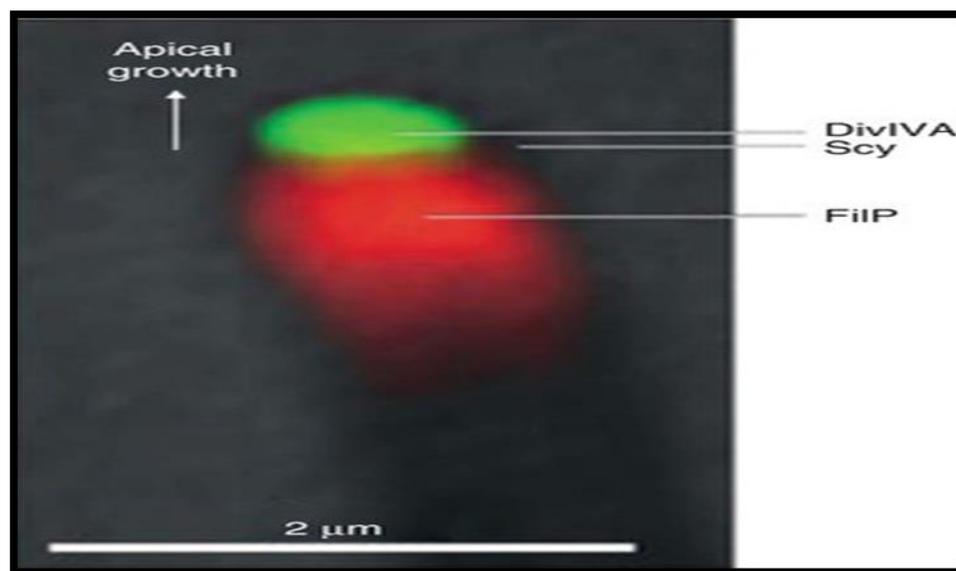
En outre, il est proposé que l'existence de cette couche qui sert d'interface entre la cellule et son environnement donnerait la fonctionnalité d'un siège sélectif à la cellulaire par lequel le passage des solutés à faible poids moléculaire est autorisé tout en excluant les grandes molécules ou structures (telles que les virus) (**Guerrero, 2000**). Concernent la capsule, certaines Actinobactéries telles que *Thermomonospora*, *Arthrobacter*, *Acidothymus* et *Nitriliruptor* produisent des capsules (**Rosenberg et al. 2014**). Bien que les capsules ne soient pas observées par la coloration de la capsule.

Certaines mycobactéries pathogènes produisent également des capsules sous forme d'une couche épaisse dans la partie la plus extérieure de la cellule. *M. tuberculosis* et *M. kansasii* possèdent des capsules contenant du glucane et des protéines, tandis que dans le cas de *M. leprae*, la capsule est composée de glycolipides phénoliques (**Daffé, 2015**).



**Figure 1** : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire trouvée dans des membres de l'ordre des Corynebacterales. Les composants ont été mis à l'échelle à l'aide des résultats obtenus par CEMOVIS pour *M. bovis* BCG (**zuber et al., 2008**).

Pour le deuxième compartiment, qui est le cytoplasme d'où il est composé de cytosquelette et les organes d'inclusion et les Microcomposants bactériens (BMCs). L'un des principaux composants du cytoplasme bactérien est le « cytosquelette », qui est nécessaire pour la détermination de la forme cellulaire, la division cellulaire et la motilité. (Graumann, 2009), (Figure 2).



**Figure 2** : Protéines du cytosquelette contribuant à la croissance apicale de *Streptomyces coelicolor*

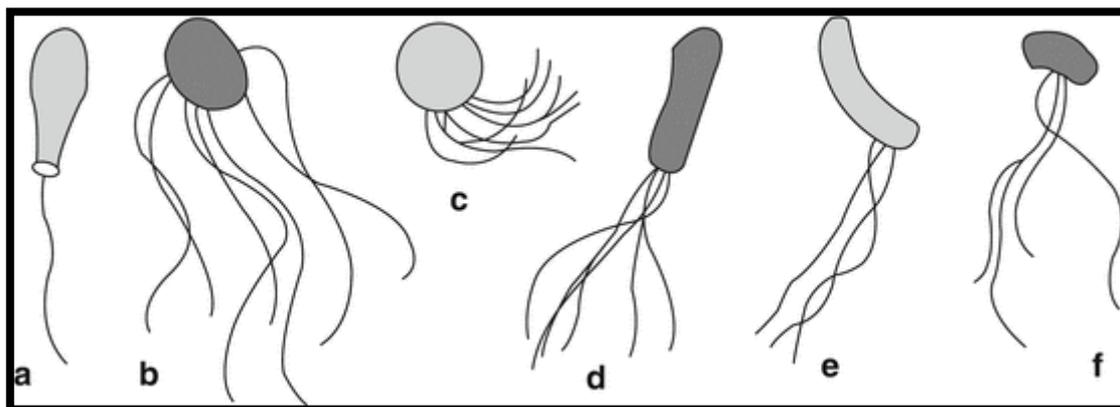
(Adapté de Fuchino *et al.*, 2013).

Les organes d'inclusions sont des compartiments de stockage intra-cytoplasmique répandus parmi les bactéries ainsi que les eucaryotes dans lesquels les nutriments s'accumulent. Les lipophiles représentent une forme efficace de stockage de l'énergie puisque les lipides fournissent plus d'énergie que les glucides et les protéines. Cette forme se trouve principalement dans les eucaryotes, bien qu'il y ait peu de bactéries appartenant aux Actinobactéries capables de stocker des triacylglycérols comme *Mycobacterium* et *Nocardia*. La formation d'inclusions d'acide polyhydroxyalcanoïque (PHA) a également été signalée chez les espèces de *Nocardia*, *Streptomyces*, *Kineosphaera* et *Rhodococcus*. (Matias *et al.*, 2009). Il est important de noter que les granules de PHA peuvent également être visualisées à l'intérieur des spores (Matias *et al.*, 2009).

En ce qui concerne les Microcomposants, sont des organites composés uniquement de protéines qui étaient auparavant considérées comme des phages en raison de leur forme polyédrique et polygonale. Ils organisent divers métabolismes en encapsulant les enzymes

pertinentes du processus métabolique et sont généralement utilisés pour optimiser les voies avec des intermédiaires toxiques ou volatils. Lorsque ces compartiments sont manquants, l'accumulation de ces composés toxiques entraînerait une toxicité cellulaire.

Il y a aussi autre structure cellulaire comme les vésicules gazeuses sont des bulles cytoplasmiques remplies de gaz, dont la fonction est de contrôler le processus de flottation de l'organisme dans des environnements aqueux, il y a aussi les pilis et les flagelles, (**Figure 3**).



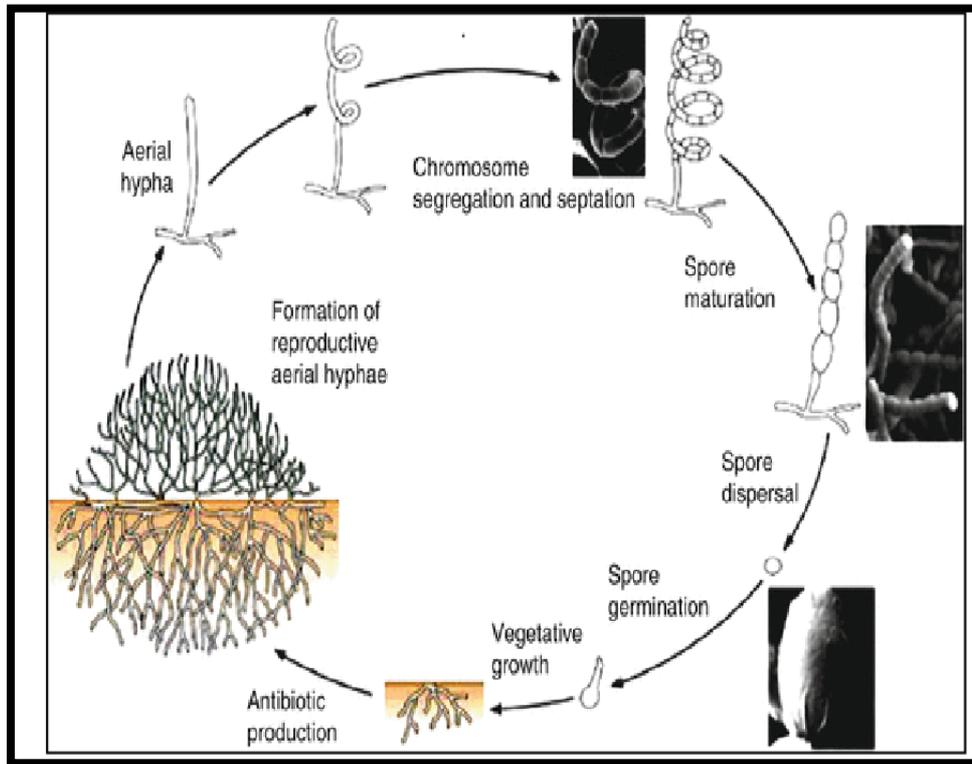
**Figure 3** : Organisations flagellées de spores actinobactérienne. a) monotrichous monopolaires, b) péritrichouses, c) polytrichoises, d) polytricouses monopoles (lophotrichos), e) polytricoïdes subpolaires et f) polytichoïdes latéraux. (**Wink et al., 2017**).

## 2.2. La diversité morphologique et métabolique des Actinobactéries

### 2.2.1. La diversité morphologique

La forme des Actinobactéries varie considérablement, allant des formes basiques de bacilles à des formes mycéliennes complexes. Le développement des Actinobactéries se caractérise par la présence de cellules filamenteuses connues sous le nom de : Les hyphes se distinguent donc par la création de spores (**Prescott et al., 2010 ; Kitouni, 2007**).

La morphologie microscopique et la chimiotaxonomie sont les principales caractéristiques (**Figure 4**), utilisées pour définir la taxonomie des Actinobactéries au niveau du genre. La question porte principalement sur la structure de la paroi cellulaire et la répartition des sucres dans toutes les cellules, ainsi que sur la couleur du mycélium, la production de pigments mélanoides diffusibles, ainsi que sur la structure et l'apparence de leurs spores (**Ranjani et al., 2016 ; Mohammadipanah et Dehhaghi, 2017**). La classification des Actinobactéries repose sur le nombre de spores, les structures de surface des spores, la forme des sporanges et la présence ou non de caractéristiques morphologiques importantes des Actinobactéries (**Dharumadurai et al., 2016**).



**Figure 4 :** Cycle de vie des Actinobactéries sporulant (Mohammadipanah et Dehghani, 2017).

### 2.2.1.1. Aspect macroscopique

Les colonies formées par les Actinobactéries sur des milieux solides, montrent différents aspects qui peuvent être regroupés en trois types :

- Des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu.
- Des colonies pâteuses, rugueuses ou lisses, rarement couvertes de mycélium aérien, et qui peuvent être facilement détachées des milieux solides.
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons (Kalakoutskii et Agre, 1976).

Ces colonies sont généralement de taille moyenne (1 à 4 mm de diamètre). Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, orange, vert, violet, rose, gris, noir (Leclerc, 1975).

### 2.2.1.2. Aspect microscopique

#### a. Morphologie mycélienne

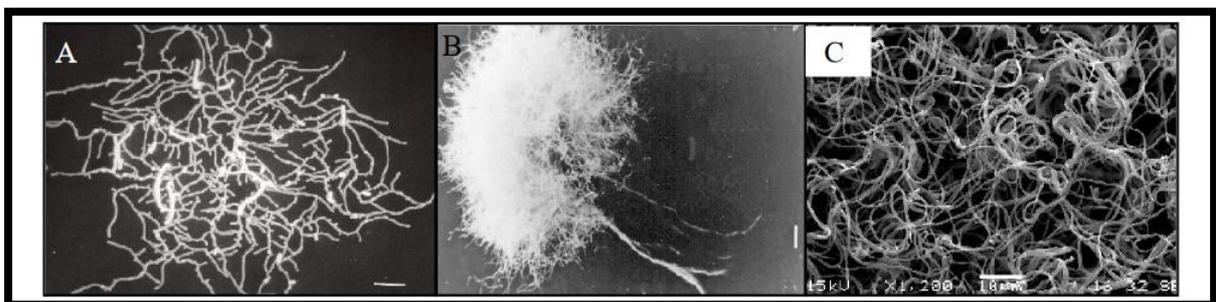
Généralement, il existe deux types de mycélium souple qui se développent par les Actinobactéries : le mycélium du substrat et le mycélium aérien.

##### 1. Mycélium de Substrat

Dans les cultures submergées et solides, les Actinobactéries constituent un substrat pour le mycélium (**Figure 5**). Toutefois, sur des surfaces solides, de nombreux individus se distinguent pour créer des hyphes aériens, dont l'objectif principal est de générer des spores de reproduction (**Flardh et Buttner, 2009**). La différenciation des *Streptomyces* morphogénétiques est diffusée dans une bactérie filamenteuse. (**Dissel et al., 2014**).

Le substrat mycélium, également connu sous le nom de mycélium végétatif ou mycélium primaire, se développe dans le milieu ou à la surface du milieu de culture. Le substrat mycélium a pour principale fonction d'absorber les nutriments nécessaires à la croissance des Actinobactéries. Les mycéliums du substrat sont visibles au microscope comme étant minces, transparents, séquentiels et plus ramifiés que les hyphes aériens. Les hyphes isolés ont une épaisseur d'environ 0,4 à 1,2 micromètres, ne présentent pas de diaphragmes et de fractures, et peuvent former des branches. Les groupes minoritaires (comme *Nocardie*), qui sont rudimentaires et fortement ramifiés, comme les racines, se divisent souvent in situ ou sur une perturbation mécanique en éléments *coccoidaux* en forme de tige, non-motile, lorsqu'ils sont cultivés jusqu'à un certain niveau.

Au microscope, les mycéliums de substrat sont minces, transparents, de phase sombre et plus ramifiés que les hyphes aériens qui sont de couleur : blanche, jaune, orange, rougeâtre, verte, bleuâtre, violette, brune, noir et d'autres couleurs. Certains hyphes peuvent produire des pigments hydrosolubles ou liposolubles (**Li et al., 2016 ; Hazari et Thakur, 2020**).



**Figure 5** : Exemples de fragmentation du mycélium de substrat de A. *Nocardia asteroides*, B. *Actinosynnema mirum* et C. *Streptoalloteichus tenebrarius* (**Li et al., 2016**).

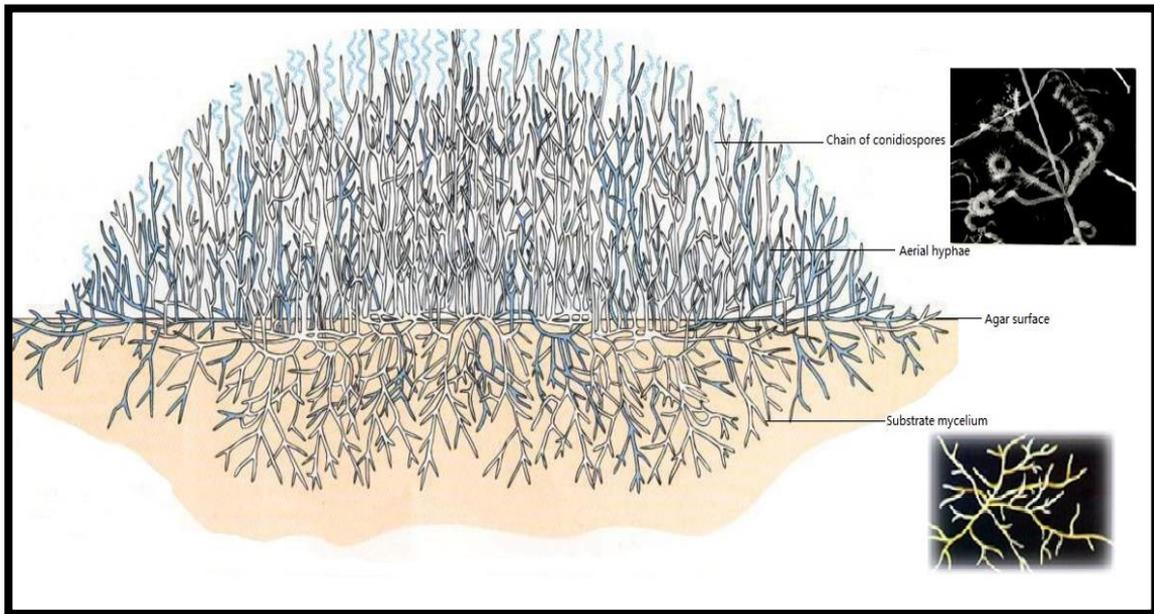
## 2. Mycélium aérien

L'hyphe aérienne, comme son nom indique, pousse dans l'air lorsque le mycélium végétatif se développe à un certain stade et développe un hyphe reproductif produisant des spores. Les hyphes aériens sont enveloppés dans une fine coque qui n'existe pas dans le mycélium de substrat (**Ensign, 1978**).

Les Actinobactéries forment un mycélium de substrat dans les cultures souterraines et solides, tandis que les hyphes aériens sont différenciés spécifiquement sur les surfaces solides, (**Figure 5**).

Il y a aussi des exceptions en termes de formation de mycélium. Par exemple, *Sporichthya sp.* Produit de courtes chaînes de mycélium aérien se divisant en spores motiles sur un médium agar tenu par le support, mais aucune formation du mycélium du substrat n'est observée. La famille des *Micromonosporaceae* est également identifiée pour développer un mycélium de substrat étendu tout en produisant des hyphes aériens rudimentaires, ou dans certains cas, aucun mycélium aérien n'est développé. D'autres taxes actinobactérienne avec le mycélium aérien absent comprennent certains *Mycobacteria*, *Kineosporia*, et *Rhodococci* ainsi que le genre *Intrasporangium* et *Tsukamurella spumae* (**Leary 1989 ; Rosenberg et al., 2014**).

Il est important de noter que la différenciation morphologique des Actinobactéries, en particulier celles qui ont une différenciation plus étendue comme les Streptomyces, est étroitement régulée et contrôlé par un mécanisme véritablement organisé à travers des gènes pertinents.

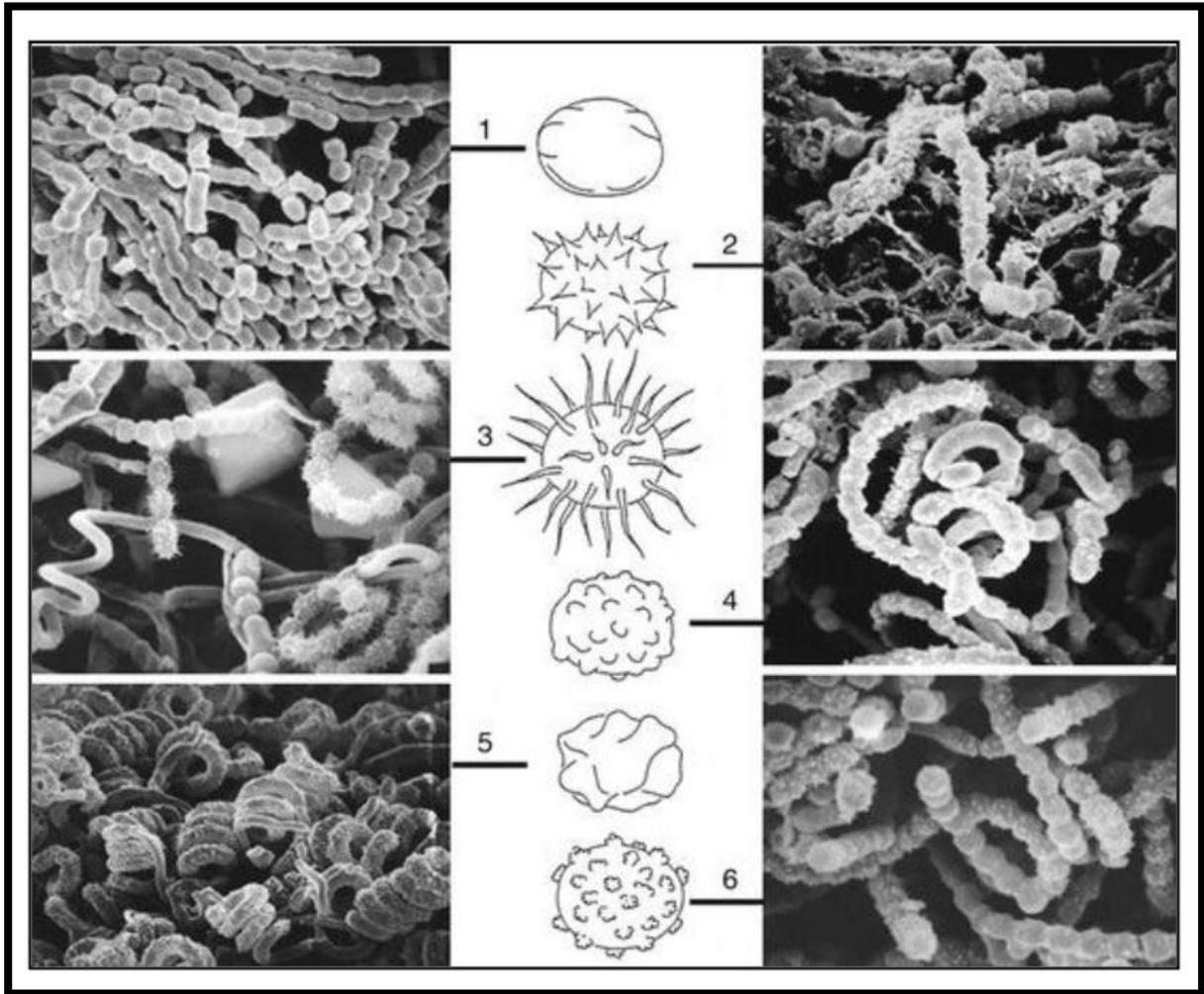


**Figure 6 :** Actinobactéries colonie se développant sur gélose (morphologie commune des Actinobactéries, la section transversale d'une colonie d'actinomycètes montrant le substrat mycélium et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores) (Prescott *et al.*, 2003).

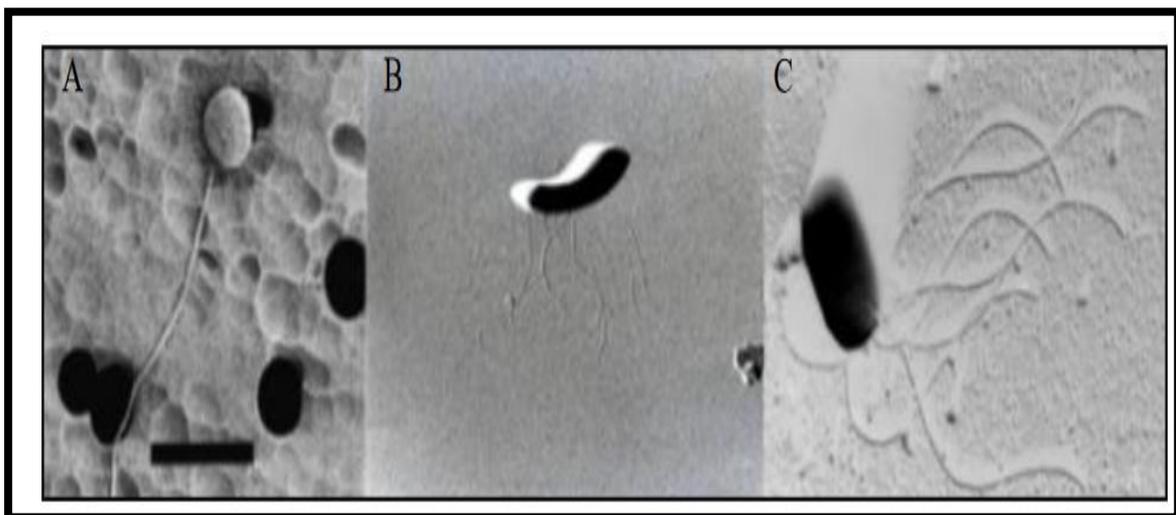
#### b. Spores

Les Actinobactéries sont principalement illustrées par leur diversité morphologique. Le mycélium prolifique, responsable de la formation de différentes formes de spores. Ces dernières peuvent avoir une épaisseur d'environ 1 à 2 m et différer en fonction de leur forme et de leur ornementation.

Les spores matures ont des couleurs variées, telles que le gris et le jaune. Il s'agit notamment de blanc, rose, jaune, lavande, bleu ou vert. Les spores présentent une morphologie courante. La forme est ovale (0,7-1,5 m), globuleuse, en forme de bâtonnet, coliforme, allantoïde et sphérique. La peau est réniforme. Il existe également des spores mobiles et non mobiles (Figure 7 et Figure 8) (Hazarika et Thakur, 2020).



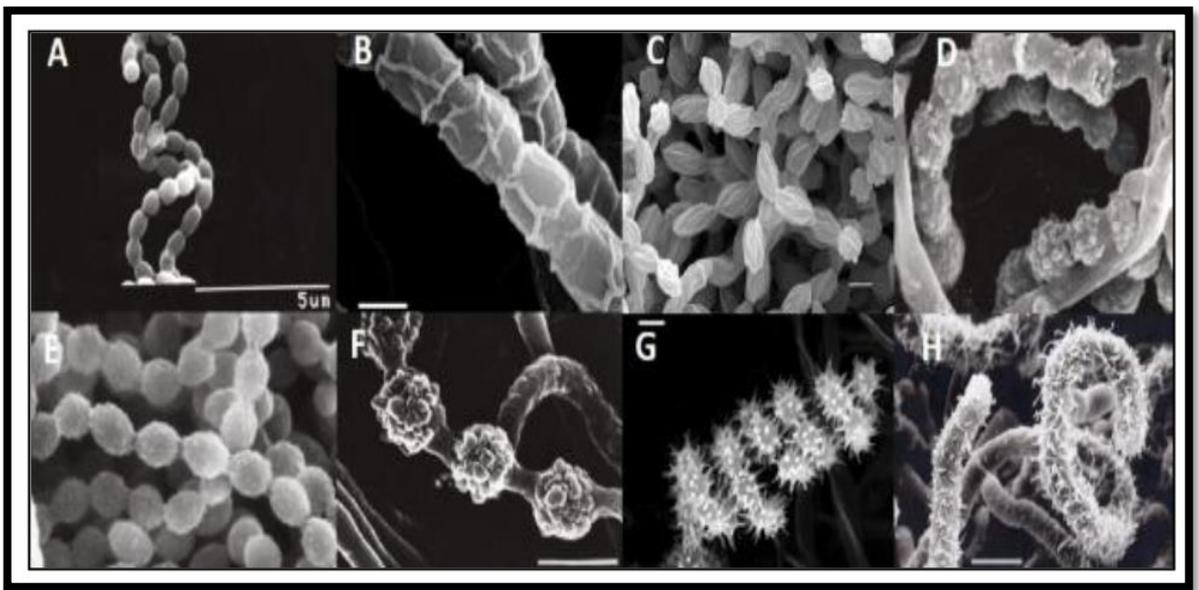
**Figure 7** : Micrographies des spores du genre *Streptomyces* prises avec le microscope électronique à balayage. 1. lisse, 2. Épineuse, 3. Poilue, 4. Verruqueuse, 5. Rugueuse, 6. épineuse (Wink *et al.*, 2017).



**Figure 8** : Micrographie de type de flagellation. A. *Kineococcus radiotolerans*, B. *Catenuloplanes* et C. *Actinoplanes regularis* (Li *et al.*, 2016).

### c. Chaînes de spores

On fonction de leur longueur et du nombre de spores, les chaînes de spores peuvent être classées morphologiquement en di- ou bi-sporés avec deux spores, oligo-sporés avec quelques spores et poly-sporés avec de nombreuses spores. La classification repose principalement sur la longueur, la forme, la position et la couleur de la chaîne de spores d'Actinobactéries. On commence par un bourgeonnement latéral le long d'un hyphe aérien, ce qui donne naissance à de courtes branches latérales. La plupart des députés sont de 7 à 20 spores sont présentes par chaîne (**Figure 9**), avec au moins 3 spores. On peut trouver des chaînes droites, crochues avec des boucles ouvertes ou disposées en spirales irrégulières avec un à quatre tours. (**Li et al., 2016**).

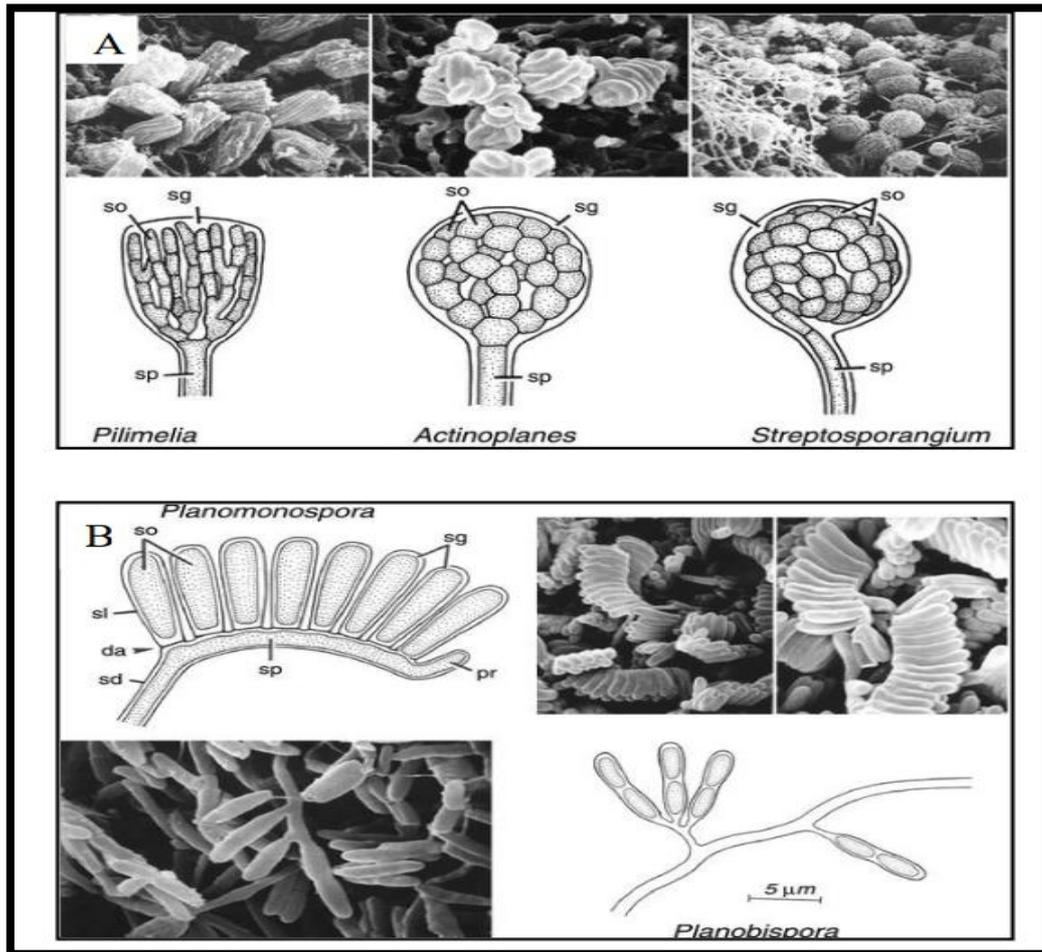


**Figure 9** : Micrographies des chaînes de spores d'A. *Streptomyces otagonensis* SANK 62589, B. *Streptomyces sp.* OM-6519, C. *Actinomadura rugatobispora* AS 6321, D. *Actinomadura sp.* ATCC 53676, E. *Streptomyces routienii* ATCC 39466, F. *Actinomadura verrucosospora* JCM 31(Li et al., 2016).

### d. Sporangies

Le sporangie est une forme de sac dont le diamètre varie de 2 à 50 µm, avec la taille la plus fréquente de 10 µm. Ils peuvent présenter des formes cylindriques, clavées, tubulaires, en forme de bouteille, campanulés, numériques, irréguliers, lobulés, ombelliformes, pyriformes ou globuleux (**Figure 10**). Les sporangies sont issus des hyphes internes ou des hyphes externes. Les sporangies se divisent principalement en deux formes. Les sporangies sont constitués de filaments enroulés de spores dans certains genres et de sporangiophores dans d'autres. Ils sont constitués d'une enveloppe sporangiale, sans paroi dite pseudosporangiale. Ce dernier type de

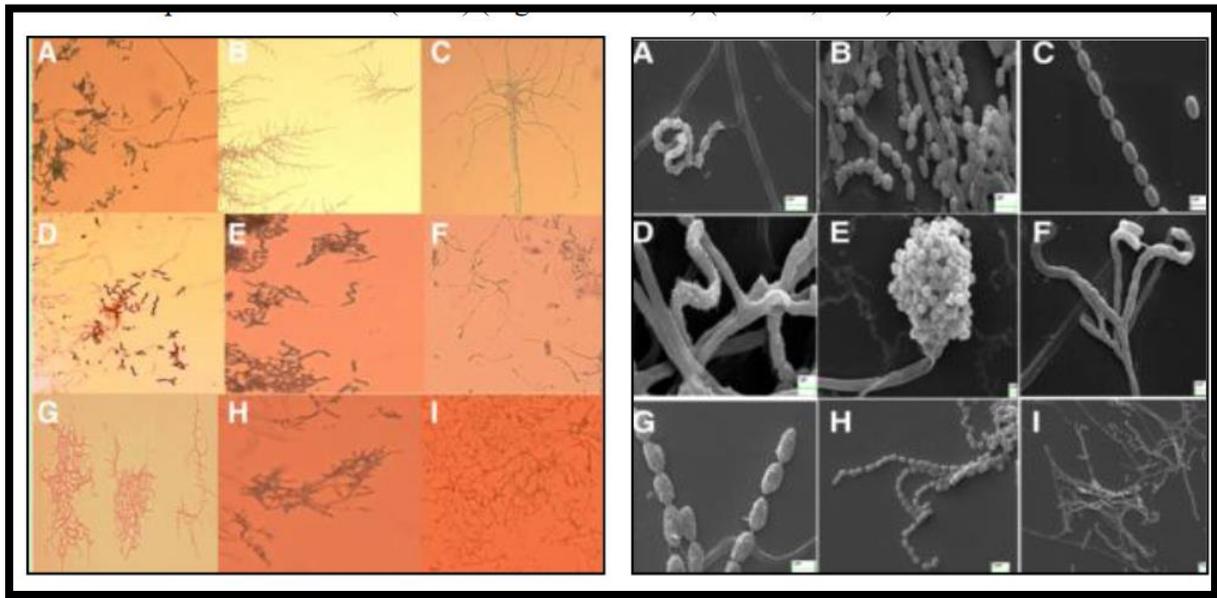
sporange présente une structure interne traditionnelle qui présente des rangées des spores enroulées ou parallèles, maintenues ensemble par l'enveloppe sporangiale. (Li *et al.*, 2016).



**Figure 10 :** Forme des sporanges chez quelques actinobactéries. A : *Pilimelin*, *Actinoplanes* et *Streptosporangium*, B : *Planomonospora* et *Planobispora* (Wink *et al.*, 2017).

### 2.2.1.3. Observation morphologique

L'observation morphologique Observer la morphologie de base des hyphes et des spores au microscope optique (**Figure 11 à gauche**) et la microstructure des surfaces des hyphes et des spores Observée en microscope électronique à balayage (MEB), la structure Spores, flagelles et cellules ultramicroscopiques observés au microscope Electronique de transmission (TEM) (**Figure 11 à droite**) (Li *et al.*, 2016)



**Figure 11** : Disposition du mycélium étudiée par microscopie à contraste de phase de neuf souches à gauche, et morphologie des sporophores étudiées en microscopie électronique à balayage de neuf souches à droite (**Sengupta et al., 2015**).

### 2.2.2. La diversité métabolique des Actinobactéries

Entre 1914 et 1939, il examinait régulièrement les bactéries et les champignons présents dans le sol recherchant des antibiotiques pour traiter la tuberculose (**Salman et Waksman, 1939**), et en 1939, il découvre aussi les effets de certaines Actinobactéries sur la croissance bactérienne, et en 1940 ont découvert l'antibiotique actinomycine (**Waxman et al., 1948**). Les Actinobactéries sont des sources prometteuses de métabolites secondaires bioactifs d'une grande importance en pharmacologie et en usage commercial. Ils jouent un rôle Important dans la production de différentes enzymes et inhibiteurs d'enzymes, par exemple plasmine et trypsine et antibiotiques tels que la chlorotétracycline et la streptomycine. En plus des pigments, certaines espèces ont la capacité de solubiliser le phosphore, et d'autres participent au contrôle de la phytopathologie et à la production de composés antifongiques (**Gebreselema, 2013 ; Hsu et Lockwood, 1975**). Ils jouent également un rôle important dans la dégradation ou la décomposition de substances organiques telles que les polysaccharides, la cellulose, l'amidon, la chitine, les acides organiques, les protéines et les graisses. Ils contribuent à la plante hôte en aidant à favoriser la croissance des plantes (promotion de la croissance des plantes : PGP) et agissent également comme agents de biocontrôle des maladies des plantes en montrant des effets antagonistes et compétitifs sur les micro-organismes phytopathogènes (**Hazarika et Thakur, 2020**).

De manière générale, les actinomycètes sont des bactéries nutritives organiques chimiques qui utilisent une variété de carbone et d'énergie, y compris des biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Cependant, plusieurs espèces peuvent également utiliser l'oxyde d'hydrogène comme source d'énergie et le dioxyde de carbone comme source de carbone pour la croissance chimique autotrophe (**Mariat et Sebald, 1990**).

Ils sont divisés en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de bactéries à métabolisme oxydatif et habite principalement le sol. Le second rassemble les bactéries en fermentation, hôte de la cavité naturelle humaine et animale. Les formes oxydatives, aérobies, sont localisées principalement dans le sol à partir duquel elles sont disséminées. L'archétype de cette catégorie est le genre *Streptomyces*. Les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, sont illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (**Mariat et Sebald, 1990**).

### 3. Rôle écologique des Actinobactéries

Les Actinobactéries D'un point de vue écologique, ils sont indispensables dans divers processus biologiques tels que les cycles biogéochimiques, la bioremédiation (**Chen et al., 2015**), le bioweathering (**Cockell et al., 2013**) et la promotion de la croissance des plantes (PGP) (**Palaniyandi et al., 2013**).

Selon **Seipke et al. (2012)**, ce type joue un rôle essentiel dans le renouvellement des produits biologiques en favorisant la dégradation enzymatique (notamment des cellulases) de la matière organique du sol et des composts (**Wei et al., 2020 ; Daquioag et Penuliar, 2021**). Et aussi sont des micro-organismes très importants en raison de leur rôle dans la fertilisation des sols (**Boudemagh, 2007**)

Selon **Mariat et Sebald (1990)**, les Actinobactéries jouent un rôle essentiel dans la fertilisation des sols, les interactions entre les particules argileuses et les hyphes ont un impact sur la structure du sol, créant ainsi une structure granuleuse viable, ce qui améliore la production. De cette manière, le genre *Frankia* joue un rôle important en tant que fixateurs d'azote dans les nodules des plantes non légumineuses, qui vivent en compagnie de nombreux arbres et arbrisseaux (**Ensign et al., 1993 ; Haansuu, 2002**). La présence des *Streptomyces* dans la rhizosphère joue un rôle crucial dans la préservation des racines des plantes en inhibant

le développement des champignons potentiellement pathogènes grâce à leur production d'antibiotiques antifongiques, ce qui a été démontré *in vitro* (Watson et Williams, 1974).

D'autre part il a été prouvé par des recherches que les Actinobactéries ont une influence importante sur la dégradation des polymères de structure complexe, tels que l'hémicellulose, la pectine, la kératine et la chitine. Ces substances se forment spontanément dans les litières en décomposition et dans les sols afin de constituer l'humus. Ils sont également impliqués dans la détérioration des composts et dans la pollution causée par l'activité humaine (Lechevalier *et al.*, 1973).

Les Actinobactéries interagissent avec les plantes et attirent ainsi l'attention de nombreux chercheurs (Valois *et al.*, 1996). Selon Becking (1974), le genre *Frankia* est très réputé en foresterie pour sa capacité à fixer l'azote atmosphérique en symbiose dans les nodules racinaires de certains arbres dicotylédones (autres que les légumineuses) tels que le casuarina, l'orme, l'aulne, etc.

Grâce à un potentiel enzymatique élevé, elles ont la capacité de décomposer des composés organiques complexes tels que la chitine, ainsi que des spores résistantes à la dessiccation (Djinni, 2009).

De plus, ces microbes ont aussi une fonction cruciale dans les écosystèmes. Selon Nouioui *et al.* (2017), les Actinobactéries jouent un rôle important dans la fixation de l'azote, la décomposition de la matière organique comme la cellulose et la lignine (Javed *et al.*, 2021), la croissance des plantes (Mitra *et al.*, 2022), la production d'acides organiques (Lasudee *et al.*, 2021) et la solubilisation du phosphate dans le sol (Soumare *et al.*, 2021). Et aussi, Grâce à cette capacité métabolique, les Actinobactéries peuvent décomposer une variété d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aliphatiques (Anandan *et al.*, 2016).

Selon Baoune *et al.* (2018), il a été prouvé que des souches endophytiques de *Streptomyces spp.* Isolées à partir de plantes cultivées dans un sol contaminé ont la capacité de dégrader le pétrole. De la même manière, Kolekar *et al.* (2014) mettent en évidence que les Actinobactéries altèrent les pesticides afin de les utiliser comme source de carbone et d'azote, ce qui favorise la dépollution des sols pollués. Selon Alvarez *et al.* (2017), le genre *Rhodococcus*, qui fait partie du phylum des Actinobactéries, joue un rôle crucial dans la dégradation de divers polluants en raison de leur aptitude à dégrader les pesticides les moins solubles.

## 4. Taxonomie des Actinobactéries

L'analyse de l'ARNr 16S fournit une bonne proposition de la position taxonomique du phylum *Actinobacteria*. Selon **Ludwig et al. (2012)**, le phylum *Actinobacteria* comprend six classes : *Rubrobacteria*, *Thermoleophilia*, *Coriobacteriia*, *Acidimicrobiia*, *Nitriliruptoria* et *Actinopacteria*. Il comprend également 5 sous-classes, 6 ordres et 14 sous-ordres. Les *Actinomycetales* est une sous-classe de la classe *Actinobacteria*, aujourd'hui restreinte aux membres de la famille *Actinomycetaceae*. Ainsi, si la classe *Actinobacteria* compte 43 familles dans le phylum *Actinobacteria*, les 5 autres classes ne comptent que 10 familles (**Ludwig et al., 2012**). Le récent développement considérable des données de séquence génomique a permis de mieux comprendre l'évolution du génome et de faciliter la catégorisation précise des micro-organismes en fonction des genres et des familles. L'arbre phylogénétique des genres *Actinobacteria* séquencés est illustré dans **la figure 12**.

Selon **Zhi et al. (2009)** et **Tang et al. (2011)**, la classe *Actinobacteria* comprend des ordres qui étaient auparavant divisés en sous-ordres dans l'ordre *Actinomycetales*, tels que les *Bifidobacteriales* et les *Jiangellales*. Dans la classe, deux clades sont présents ; le premier clade comprend les ordres *Actinopolysporales*, *Glycomycetales*, *Corynebacteriales*, *Micromonosporale*, *Jiangellales*, *Propionibacteriale*, et *Pseudonocardiales*. Les ordres *Actinomycetales*, *Kineosporiales*, *Bifidobacteriales* et *Micrococcales* forment le deuxième clade. De plus, l'ordre *Frankiales* ne fait pas partie d'un clade et se divise en lignées indépendantes à la base de l'arbre, telles que les familles *Frankiaceae*, *Acidothermaceae*, *Cryptosporangiaaceae*, *Nakamurellaceae*, *Geodermatophilaceae* et *Sporichthyaceae* (**Ludwig et al., 2012**).



## 5. Distribution et habitat des Actinobactéries

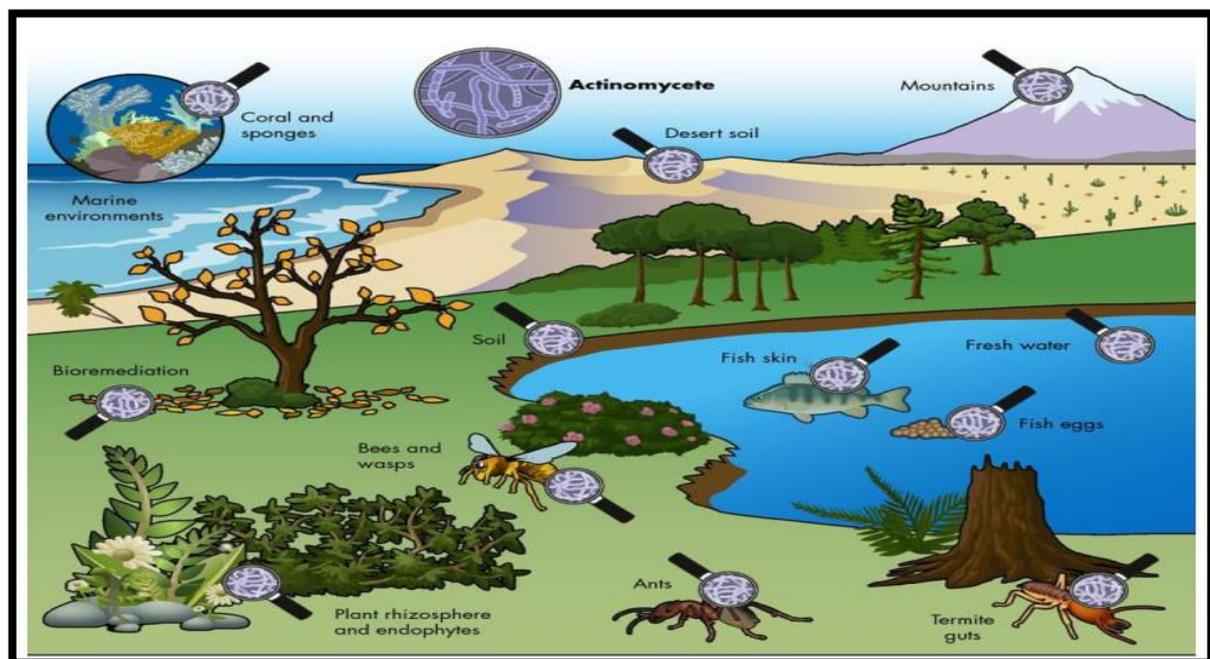
### 5.1. Environnement Terrestre

Les Actinobactéries libres sont ubiquitaires (**tableau 01**), ont été isolés dans divers endroits, y compris, les écosystèmes du sol, l'eau douce, les sources chaudes marines, les sites miniers, ainsi que dans des environnements extrêmes (**figure 13**).

Le sol demeure le principal habitat des Actinobactéries, les Streptomycètes étant une composante essentielle de leur population. Plusieurs rapports indiquent que le genre *Streptomyces* est le plus fréquent dans toutes les études effectuées. Les Actinobactéries terrestres présentent une variété d'antimicrobiens potentiellement intéressants. Ils ont découvert des Actinobactéries qui peuvent générer de nouveaux antibiotiques ayant une activité antibactérienne puissante (**Oskay et al., 2005**), et des espèces d'Actinobactéries comme *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Nocardioform* ont été découvertes en grande quantité dans la rhizosphère anoxique des mangroves, même si leur concentration est 1000 à 10000 fois inférieure à celle des terres arables en raison de l'impact des marées (**Tan et al., 2009**). De manière similaire, *Nocardia* extraite du sol de mangrove a généré de nouveaux métabolites cytotoxiques qui étaient très inhibiteurs pour les lignées.

Le sol désertique est aussi perçu comme un milieu terrestre extrême où seules certaines espèces, en particulier les Actinobactéries, sont souvent nourries par *Microcoleus*. Différents rapports indiquent la répartition des Actinobactéries dans différents milieux, tels que les sols sableux (Cario, Égypte ; Falmouth, MA), les sols alcalins noirs (Karnataka, Inde), les sols limono-sableux (Keffi Metropolis, Nigeria ; Presque Isle, PA), les sols désertiques alcalins (Wadi El Natrun, Égypte ; Wadi Araba, Égypte), et les sols désertiques subtropicaux (Thar, Rajasthan), où les espèces de *Streptomyces* étaient prédominantes, suivies par d'autres organismes comme *Nocardia*, *Nocardiosis* et *Actinomycetes* (**Schneider et al., 2006**).

Les Actinobactéries cultivables morphologiquement différentes ont été identifiées à partir de 10 échantillons de sols désertiques. Ces isolats ont démontré leur capacité à se cultiver, (**Nithya et al., 2015**).



**Figure 13 :** Écologie des Actinomycètes. Les Actinomycètes libres sont omniprésents dans les écosystèmes du sol, ainsi que dans les écosystèmes marins et d'eau douce (**van der Meij et al., 2017**).

**Tableau 1 :** La distribution de quelque genre des Actinobactéries dans la nature (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumière, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matériaux autochauffants
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporallgium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

## 5.2. Environnement aquatique

Les Actinobactéries se trouvent en grande quantité dans les milieux aquatiques, où elles peuvent parfois être emportées par les milieux terrestres environnants. Il est essentiel

d'interpréter le nombre et les types d'Actinobactéries en se basant sur les données sur des organismes comme *Thermoactinomyces* et *Rhodococcus coprophilus*, qui sont des indicateurs très précis de la composition terrestre des propagules d'Actinobactéries dans l'eau et les sédiments. Les endospores résistantes de *Thermoactinomyces* se forment dans les composts auto-échauffants, les fourrages surchauffés et les sols de surface, mais elles peuvent être transportées dans les milieux aquatiques où elles se fixent dans les boues et les sédiments **(Makkar et Cross, 1982)**.

Les zoospores ont la capacité de se déplacer grâce à un toupet de flagelles qui présente une chimiotaxie et requièrent une énergie externe. *Micromonospora* est aussi une Actinobactérie courante en eau douce et est endémique de ces milieux où elle décompose la cellulose, la chitine et la lignine. La présence de *Micromonospora* dans les ruisseaux, les rivières et les sédiments fluviaux a été confirmée par de nombreux rapports et est considérée comme une composante essentielle de la microflore aquatique. Selon **(Johnston et Cross, 1976)** il a été observé que les Streptomycètes ne pouvaient pas se développer dans différents lacs, en particulier dans les couches de boue plus profondes où les *micromonosporae* étaient majoritaires. De plus, une autre étude a révélé une corrélation significative entre les *micromonosporae* et *thermoactinomycètes* isolés de la rivière Wharfe dans le West Yorkshire, où un nombre plus élevé de *micromonosporae* a été découvert dans le sol environnant **(Al-Diwany et al., 1978)**. Les spores de *Micromonospora* ont été lavées dans les habitats d'eau douce où elles peuvent rester immobiles pendant plusieurs années **(Cross, 1982)**, malgré le lavage continu des spores de Streptomycètes dans les habitats d'eau douce et marine, il n'existe pas de preuves qu'elles puissent être actives dans ces milieux. On a affirmé l'existence de Streptomycètes aquatiques, mais selon une autre étude confirme qu'il Ya une forte corrélation entre les comptes de Les *streptocoques fécaux*, les *streptomycètes* et les *Rhodococci*, et *Actinomadura madurae*, *Mycobacterium kansasii* et des espèces d'*Arthrobacter*, *Corynebacterium* et *Nocardia* sont d'autres habitants des eaux douces. Le nombre de *Streptomycètes*, *Micromonosporae* et *Rhodococci* dans l'écume sur l'eau de rivière peut être augmenté en raison de la présence de spores et d'hyphes hydrophobes à l'interface eau/air. D'après les données, il est évident que les Actinobactéries peuvent être actives dans les écosystèmes d'eau douce en présence de substrats et de conditions de croissance adéquates, plutôt que de s'adapter spécifiquement **(Al-Diwany et al., 1978)**.

### 5.2.1. Eau douce

Il est aisé d'isoler les Actinobactéries des sites d'eau douce. Des endospores d'*Actinoplanes*, de *Micromonospora*, de *Rhodococcus*, de *Streptomyces* et de *Thermoactinomyces* sont les principaux types d'Actinobactéries présents dans ces milieux. On retrouve souvent *Actinoplanes* dans les sols, les rivières et les lacs, et ses spores peuvent échapper à une dessiccation prolongée, mais les spores motiles sont libérées lors de la réhydratation. Une autre Actinobactéries courante en eau douce, *Micromonospora*, participe à la dégradation de la cellulose, de la chitine et de la lignine. Les Streptomycètes, même s'ils sont lavés en permanence dans les milieux d'eau douce, n'exercent que peu d'activité dans ces milieux. Les *Micromonosporae*, quant à eux, sont majoritaires dans les couches de boue plus profondes des lacs. D'autres espèces aquatiques sont *Actinomadura*. *Mycobacterium kansasii*, ainsi que des familles d'*Arthrobacter*, *Corynebacterium* et *Nocardia* est présente. Les données suggèrent que les Actinobactéries peuvent être actives dans les écosystèmes d'eau douce en présence de substrats et de conditions adéquates, plutôt que de s'adapter spécifiquement à vivre dans de tels milieux (Cross, 1967).

### 5.2.2. Marine

Si la diversité actinobactérienne est comparée à celle de l'environnement terrestre, la plus grande diversité est présente dans les océans. Les océans sont une réserve inexploitée de nouvelles espèces d'Actinobactéries, ce qui entraîne la création de nouveaux métabolites. Les Actinobactéries marines qui vivent dans des milieux très différents génèrent des composés bioactifs qui diffèrent des composés terrestres. Les Actinobactéries marines ont été confrontées à des conditions de pression extrêmement élevées et anaérobies, avec des températures inférieures à 0 à 8 °C sur les fonds marins profonds, ainsi qu'à des conditions très acides avec des températures supérieures à 8 à 100 °C près des sources hydrothermales des dorsales médio-océaniques. L'existence d'Actinobactéries marines est soutenue par *Rhodococcus marinonascens*, la première espèce d'Actinomycètes marins identifiée. Les espèces de *Dietzia*, *Rhodococcus* et *Streptomyces*, Les Actinobactéries marines indigènes sont *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris* et *Verrucosipora* (Bull et al., 2005), (Stach et al., 2004)

Il a été démontré que les Actinobactéries constituent environ 10 % des bactéries présentes dans les agrégats organiques marins, et que leur activité antagoniste pourrait jouer un rôle très important dans le maintien de leur présence, ce qui a un impact sur la dégradation et la minéralisation de la matière organique (Grossart et al., 2004).

Diverses études récentes confirment la présence d'actinobactéries marines indigènes dans les océans et la distribution des Actinobactéries marines dans divers milieux et habitats marins, comme *Dietzia maris*, *Rhodococcus erythropolis* et *Kocuria erythromyxa* (**Inagaki et al., 2003**).

A partir d'une carotte de sédiments sous-marins recueillie à une profondeur de 1 225 mètres près de Hokkaido, Cinq nouveaux phototypes d'Actinobactéries ont été identifiés à partir de sédiments marins recueillis autour de l'île de Guam (**Jensen et al., 2005**).

De la même manière, on a également identifié des Actinobactéries à partir d'échantillons prélevés dans l'abîme le plus profond, le Challenger Deep au large des Mariannes, à une profondeur de 10 923 mètres (**Stach et al., 2004**).

Des éponges ont été découvertes avec des Actinobactéries inhabituelles, des *Micrococceae*, des *Dermatophilaceae* et des *Gordoniaceae*, et ont identifié 17 Actinobactéries à partir d'échantillons de sol provenant des marais salants de Cuddalore et Parangipettai, et ont examiné leur activité antibactérienne initiale, notamment *Streptomyces spp.* et *Saccharomonospora sp* (**Dhanasekaran et al., 2005**).

En particulier, Une activité antimicrobienne prometteuse a été observée dans les échantillons collectés contre diverses bactéries. Un composé antibactérien  $\beta$ -lactame (**Dhanasekaran et al., 2014**) a isolé et analysé le méthyle à partir de *Streptomyces noursei* DPTD21 dans le sol de marais salants de Parangipettai Porto Novo dans le district de Cuddalore, Tamil Nadu. Dans une autre recherche, on a recueilli des échantillons de sol et de sédiments dans divers endroits de la région de mangrove de Muthupet, et on a identifié des Actinobactéries, telles que *Streptomyces sp*, CC17 et SM13, *Streptosporangium sp.* SH15 et *Micropolyspora sp.* S22, qui ont démontré une activité larvicide maximale contre les larves de moustiques anophèles (**Dhanasekaran et al., 2010**).

Toutes les Actinobactéries citées précédemment ont été isolées des milieux marins tels que les profondeurs des fonds marins, les invertébrés marins et la neige marine, le sol des rivages marins et les sédiments des eaux. Les écosystèmes uniques des rivages marins et des grands fonds marins sont représentés par le sol des rivages marins et les sédiments des grands fonds marins. De la même manière, ces isolats génèrent différents métabolites inédits. Malgré les efforts de dépistage limités réalisés jusqu'à présent sur les Actinobactéries marines, le taux de découverte de nouveaux métabolites secondaires issus d'Actinobactéries marines a

récemment dépassé celui de leurs homologues terrestres, comme le montre l'isolement de nombreuses nouvelles entités chimiques à partir d'Actinobactéries marines.

## 6. Autres habitats des Actinobactéries

Les Actinobactéries aussi connu avec sa capacité à survivre dans des environnements extrêmes Comme le montre le tableau suivant (**Tableau 02**).

**Tableau 2** : Actinobactéries isolés de divers habitats écologiques (**Khanna et al., 2011**).

<b>Actinobactéries</b>	<b>Habitats</b>
<i>Actinomadura, Actinosynnema, Amycolatopsis, Arthrobacter, Frankia, Geodermatophilus, Gordonia, Kitasatospora, Micromonospora, Mycobacterium, Nocardioides, Nocardiosis, Nonomurea, Psuedonocardia, Rhodococcus, Saccharopolyspora, Salinispora, Streptomyces, Streptosporangium, Tsukamurella, Verrucosispora, Williamsia</i>	Marine
<i>Actinomadura, Amycolatopsis, Bogoriella, Kribbella, Microbispora, Micromonospora, Nocardia, Nonomurea, Nocardiosis</i>	Sols acides et alcalins
<i>Bifidobacterium, Rhodococcus, Nocardia, Gordonia</i>	Eaux usées et échantillons fécaux
<i>Actinomadura, Micromonospora, Microtetraspora, Saccharomonospora, Streptomyces, Thermoactinomyces</i>	Sources chaudes
<i>Actinomadura, Amycolatopsis, Microbispora, Microtetraspora, Nocardia, Nocardiosis, Saccharothrix</i>	Désert
<i>Amycolatopsis, Laceyella, Planifilum, Saccharomonospora, Streptomyces, Thermoactinomyces, Thermobifida, Thermoflavimicrobium, Thermonospora, Thermus</i>	Piles de compost
<i>Arthrobacter, Friedmanniella, Modestobacterium, Nocardia, Nocardiosis, Pseudonocardia, Streptomyces</i>	Échantillons glaciaires
<i>Streptomyces</i>	Traitement par radiations (radiotraité)
<i>Amycolatopsis, Arsenicococcus, Catellatospora, Fodinicola</i>	Champs miniers
<i>Actinoplanes, Couchiplanes, Catenuloplanes, Microbispora, Saccharopolyspora</i>	Champs agricoles
<i>Amycolatopsis, Gordonia, Nocardia, Rhodococcus</i>	Échantillons cliniques d'humains et d'animaux

De nombreux chercheurs ont confirmé que les Actinobactéries se trouvent dans des environnements extrêmes où elle est présente dans des sols pollués contenant des métaux (**Jordan et Le chevalier 1975**), des hydrocarbures ou du pétrole (**Nesterenko et al., 1978**), et dans des eaux usées, des sols issus de milieux climatiques extrêmes et désertiques (**Boudjella et al., 2006, Badji et al., 2007**). On les trouve également dans les glaciers (**Bozal et al., 2009**), l'eau des fjords (**Hakvag et al., 2008**) et aussi dans les milieux hyper salins (**Tang et al., 2009**). Elles sont présentes dans des sols polaires gelés en permanence tout comme dans les lacs extrêmement alcalins (**Kitouni, 2007**), ainsi que dans les environnements contaminés par des résidus industriels contenant du chrome et du fer (**Brito et al., 2013**).

Ces bactéries ont également été découvertes dans les cours d'eau extrêmement acides du Rio Tinto (Huelva, Espagne), telle que les mycobactéries (**García-Moyano et al., 2008**).

Les Actinobactéries ont été également mentionnées dans l'environnement extrême et hétérogène des pentes minières en Chine au niveau du phylum (*Acidimicrobiens* et *Rubrobacterales*) (**Liu et al., 2014**). Et aussi ont été observés dans les sols hyperarides du désert d'Atacama (**Bull et Asenjo 2013 ; Okoro et al., 2009**).

Les membres actinobactérienne ont également été trouvés dans un environnement volcanique terrestre sans fond situé en Islande (**Herrera et al., 2009**). Aussi il y a des recherches montrées que certaines espèces comme *Kocuria sp.* se trouvent dans la source radioactive d'Ab-e-Siah (**Asgarani et al., 2012**).

En plus de leur présence dans ces environnements les Actinobactéries présentent aussi dans le corps humain, sont distribuées dans différents endroits du corps humain tels que le tronc, les jambes, l'oreille, le nez et la bouche (**Lemon et al., 2010**) surtout le genre *Corynebacterium*.

## **7. Application et implication**

### **7.1. Utilisation des Actinobactéries en biotechnologie**

Les Actinobactéries sont très hétérogènes biochimiquement et ont la capacité de produire les métabolites secondaires d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique (**Abbas, 2006**), qui est la source la plus importante de la production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs (**Valan arasu et al., 2009**), certaines espèces des Actinobactéries produisent jusqu'à 75 à 80 % des antibiotiques (**Mellouli et al., 2003**), parmi les métabolites synthétisés sont les enzymes Bases, inhibiteurs d'enzymes, vitamines, immunomodulateurs (**Badji, 2006**), herbicides, insecticides ou antiparasitaires (**Li et al., 2005**).

Les Actinobactéries sont également présentes dans la biotechnologie, et en particulier dans la biotechnologie végétale parce que les souches ont une activité anti-agentielle. Les pathogènes des plantes peuvent être utiles dans la lutte biologique. L'étape la plus importante pour la révolution à la "technologie écologique" c'est la vente de ces ferments. Il est démontré que la production des enzymes d'endo-glucanases à partir de *Streptomyces sp.* Sur des supports peu coûteux, donc ces projets de production économique d'autres enzymes et métabolites peuvent être incluse. Les Actinobactéries ne se limitent pas à la conversion des enzymes, elle a aussi la capacité de contrôlé biologiquement les agents pathogènes des plantes dépendant du substrat est également assuré. Les enzymes de ces bactéries dégradent l'acyl-homéomérie-lactone par quorum-sensing. *Streptomyces lunalinharesii* synthétise des produits des antimicrobiennes contre les bactéries sulfate-réductrices communément responsables généralement à des maladies. Les Actinobactéries ont une importance dans le domaine de la corrosion dans le secteur pétrolier, pouvant substituer aux biocides existants. Il existe également une méthode efficace pour l'alimentation aussi par l'ajout d'antioxydants Naturellement comme les amylases, lipase, xylanase, pectinase, protéase, etc. La chitinase et la cellulase produites à partir des actinobactéries ont un rôle important à jouer dans l'industrie agroalimentaire, la fermentation, le textile et le papier (Nawani, 2013).

Certaines espèces ont la capacité de solubiliser le phosphore, d'autres sont impliquées dans le control phytopathologique et dans la production des composés antifongiques en tant que PGPR. En effet, les Actinobactéries produisent 47 % des molécules bioactives issues de microorganismes, découvertes entre 1940 et 2010 parmi lesquelles 24 % sont issues d'Actinobactéries rares isolés à partir des écosystèmes salins (Nafis *et al.*, 2019)

#### 7.1.1. Production des Antibiotiques

Les Actinobactéries ont la capacité de synthétiser un grand nombre de métabolites bioactifs Y compris les antibiotiques (Oskay *et al.*, 2004), ces propriétés reflètent La richesse du métabolisme cellulaire de ce microbiote. Les principales antibiotiques produits par les Actinobactéries sont antibactérien, antifongique, anticancéreux, antiviral ou antiparasitaire (Gebreyohannes, 2013 ; Lévo et Bois, 1993 ; Oski *et al.*, 2004). Les antibiotiques suscitent un grand intérêt en santé humaine, animale, animale et agricole (Leveau et Buix, 1993).

**a. La synthèse des antibiotiques par le genre *Streptomyces***

Les Streptomycètes peuvent produire une grande variété de métabolites, (**Tableau 3**), ils sont les plus répandues et appliqués dans le domaine de la santé humaine et animale (**Colombié, 2005**).

Actuellement, les Streptomycètes produisent 80% des oligosides, des -lactamines et des tétracyclines, Anthracyclines, ansamycines, macrolides, polyènes, nucléosides et de cette liste comprend la néomycine et la streptomycine principalement, ces derniers proviennent de *Streptomyces griseus* et de *Streptomyces fradiae*. Les Streptocoques sont protégés par leur propriété bactéricide, fongicide et herbicide, et les bactéries Gram-positives et les bactéries multi-résistantes (**Rudi et al., 2012**). À ce jour, près de 10 % de ces molécules sont très utilisées dans le domaine thérapeutique, humain, vétérinaire, agriculture et l'industrie agroalimentaire, (**Tableau**)le type de composé synthétisé est unique pour chaque espèce productrice (**Demain, 2000 ; Colombié, 2005**).

**Tableau 3** : Antibiotiques courants synthétisés par les *Streptomyces* (**Germain, 2000**).

Classe chimique	Antibiotique	Producteur	Cible
<b>Aminoglycosides</b>	Streptomycine Spectomycinee Néomycine	<i>S. griseus</i> <i>S. spp</i> <i>S. fradiae</i>	La plus par des Grams – M. tuberculose Large spectre
<b>Tétracycline</b>	Tétracycline chlorotétracycline	<i>S. aureofaciens</i> <i>S.</i> <i>aureofaciens</i>	Large spectre gram +et -
<b>M2acrolide</b>	Spiramycine Erythromycine clindamycine	<i>S. Ambofaciens</i> <i>S. erythreus</i> <i>S. lincolnensis</i>	Streptocoque, néserei etmycoplasme Et la plus par des grams+ anaérobie stricte
<b>Polyéne</b>	Nystatine Emphocitine B	<i>S. noursei</i> <i>S. nodosus</i>	Champignon : <i>candidat</i> Champignon
<b>Sans classe</b>	Chloemphynicol	<i>S. venezulae</i>	Large spectre de candidat

**Tableau 4** : importance médicale de certains antibiotiques produits par le genre *Streptomyces* et leurs maladies ciblées (Bouchlaghem et Aggoum, 2020).

Organismes ou maladie ciblée	Antibiotiques	Organismes producteur
Typhoïde	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Tuberculose et Lèpre	Rifampicine	<i>Amycolatopsis</i> <i>Streptomyces mediteranei</i>
Staphylococcus aureus Méthicilline résistant (SARM)	Vancomycine	<i>Amycolatopsis</i> <i>Streptomyces orientalis</i>
Cancer	Daunomycine	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>
Pathogènes résistants à la Pénicilline	Acide clavulérique	<i>Streptomyces clavuligerus</i>

#### b. Production des antibiotiques par le genre *Micromonospora*

Le *Micromonospora* est généralement classé deuxième selon les classements. Les substances actives provenant de *Streptomyces* sont connues pour diverses activités. Ces métabolites sont principalement des antibiotiques (Mcneil et Brown 1994). *Micromonospora* possède une grande capacité à produire des variétés d'antibiotiques. L'espèce *Micromonospora purpurea* produit de l'aminoglycoside et la doxycycline, Cet événement a permis de mettre au point le dépistage des antibiotiques c'est pour ça les espèces de ce genre sont devenues une source prolifique de métabolites bioactifs. Plusieurs types d'antibiotiques peuvent être générés par les bactéries de ce genre comme les Aminoglycosides, la gentamicine, la sisomicine et la fortimicine sont également des substances importantes et la synthèse des macrolides (mycinamicine, rosamicine) antigénique (Kirby et Meyers, 2010).

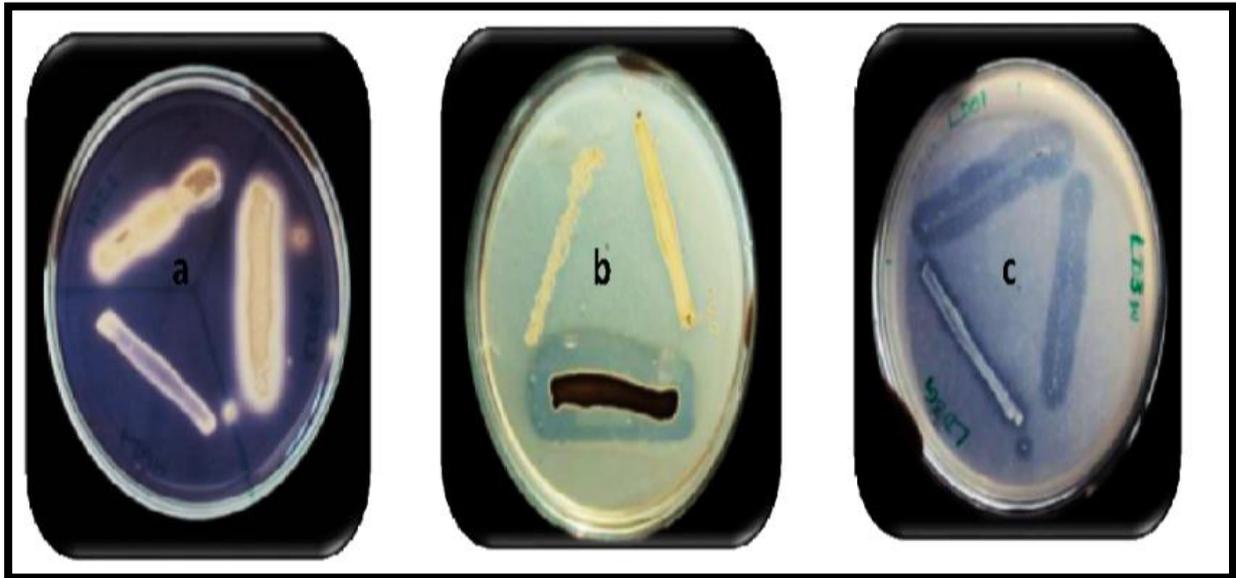
#### c. Production des antibiotiques par le genre *Nocardia*

Les souches du genre *Nocardia* produisent de nombreux types des antibiotiques (antibactériens terpénoïdes, macrolides et lactones). Les souches qui produisent ce genre de production sont *Nocardiaopsis dassonvillei* et *Nocardia*. Ces espèces sont principalement actives contre les agents pathogènes à Gram négatifs comme *Nocardia mutabilis* et *Nocardia syringae* et *Nocardia alba* (Zerizer, 2014). Le nargénicine A1 est un antibiotique isolé provenant de

*Nocardia sp.*, originaire de la région de Corée. Il a principalement une forte activité antibactérienne contre le *Staphylococcus aureus* dans le sud. (Maharjan *et al.*, 2011).

### 7.1.2. Production d'Enzymes

Les Actinobactéries synthétisent de nombreuses enzymes, (Figure 14) telles que chitinases, glucanases, peroxydases et glutamines (Tokala *et al.*, 2002), et d'autres espèces qui produisent des amylases, des cellulases et des hémicellulases. La lignine est dégradée en dégradant les cellulases. (Divya *et al.*, 2014). D'autres types comme les *Streptosporangium sp.* Est extrait des feuilles de maïs qui produisent des glucoamylases exploitées utilisées dans l'Industriel pour la dégradation de l'amidon (Hasegawa *et al.*, 2006). Certaines souches d'Actinobactéries produisent également des lipases et les triglycérides qui sont hydrolysés en diglycérides, monoglycérides, glycérols et acides gras comme *Streptomyces albovinaceus*, *Streptomyces Oiseaux*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces setonii* et d'autres (Sommer *et al.*, 1997). Les enzymes sont produites par *Streptomyces virginiae* sont les chitinolytiques (chitinases et cellulases), elles sont considérées comme l'action antagoniste grâce à leur action directe parce qu'elles sont les plus efficaces pour contrôler certaines maladies fongiques aux chitinases (Macagnan *et al.*, 2008). Parmi les enzymes les plus importantes, les protéases qui représentent plus de 65 % à des agents blanchisseurs peuvent être utilisés dans des applications industrielles telles que les détergents ou la peinture ou dans les réactions des peptides (Thumar et Singh, 2007). Les *Streptomyces* produisent différents types d'enzymes, tels que les protéases, les Lipases, les cellulases, les amylases, les pectinase et les xylanase ; ((xylose isomérase) par *Streptomyces thermophile*) ... etc., qui présentent un grand intérêt en biotechnologie (Colombié, 2005). Le groupe le plus important des enzymes industrielles est constitué des protéases qui sont responsables de près de 60% des enzymes bactériennes totales produites par *M. griseus*, *M. rimouises*, *M. thermoviolaceus*, *M. thermovulgaris*. Les Actinobactéries sont les principaux producteurs de bactérienne. (Jayashree *et al.*, 1995). Du point de vue principal, la protéase alcaline est d'un intérêt certain biotechnologique comme dans l'alimentation, le nettoyage, l'industrie pharmaceutique, cuir industrie, tanneries... etc. (Jayasree *et al.*, 1995).



**Figure 14** : Différents types d'enzymes produites par Actinobactérie. a. Amylase. b. Protéase. c. Lipase. La zone D'inhibition autour des Actinobactéries inoculées confirme la production d'enzyme particulière (<https://www.intechopen.com/chapters/49873>).

#### 7.1.2.1. Production des enzymes par le genre *Micromonospora*

L'enzyme protéolytique est produite en utilisant le genre *Micromonospora*. Qui dégrade la cellulose, la chitine, la lignine et l'hydrolyse et les matières végétales, les fumiers, la paille et les tiges qui sont décomposés dans les composts. Par exemple chez les termites ou les tripes et le rumen des bovins ; il y a certaines espèces de ce genre qui sont capables de décomposer les divers éléments organiques (Hirsch M *et al.*, 2009). En plus des enzymes protéolytiques et les enzymes hydrolytiques actives sont produites par les microorganismes. Le pouvoir de synthèse de ces enzymes hydrolytiques il est possible pour ces bactéries de se développer dans plusieurs foyers saprophytes. Ces microorganismes sont endophytes au sein des usines grâce à cette activité enzymatique. Ils colonisent la surface des feuilles des plantes (Hirsch *et al.*, 2009 ; Daduang, 2015).

#### 7.1.3. Production de Sidérophores

Le microélément le plus important utilisé par les bactéries est le fer, (Djibaoui *et al.*, 2005). La nature contient cet élément sous des formes insolubles ; donc les plantes et les bactéries ne peuvent pas les assimiler, c'est pourquoi les bactéries et les champignons ont développé de nombreux systèmes de chélation de fer qui utilisent le plus. Les sidérophores sont souvent présents (Mirinda *et al.*, 2007). Ils se dissolvent et emmènent le fer vers le micro-

organisme via des récepteurs dédiés (**Cabrera et al., 2001**). Les Streptomycètes solaires produisent des sidérophores *Streptomyces fulvissimus* ATCC. (**Muller et al., 1984**).

#### **7.1.4. Production des vitamines**

Les Actinobactéries sont pratiquement absents dans cette zone, mais historiquement on peut citer la production de vitamine B12 par *Streptomyces olivaceus*, qui a longtemps été remplacée par d'autres bactéries beaucoup plus productives (**Leveau et Bouix, 1993**).

## **7.2. Importance des actinobactéries médical (la biotechnologie rouge) et pharmaceutique**

### **7.2.1. Agents Antifongiques**

Parmi les traitements antifongiques actuels, seuls les polyènes macrolactones, produits par les Actinobactéries, jouent un rôle significatif (**Tanaka, 1992**). Actuellement, l'amphotéricine B est le seul composé connu utilisé en traitement systémique contre les infections fongiques. Ce médicament, décrit par Trejo et Bennett (1963) comme étant produit par *Streptomyces nodosus*, agit en interagissant avec l'ergostérol, un composant des membranes cellulaires des champignons et des mycoplasmes absents chez les mammifères. Cette interaction entraîne une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions potassium, conduisant à une fuite cellulaire. Cependant, ce composé présente une toxicité en se liant de manière non sélective aux stérols humains en plus de l'ergostérol. Actuellement, l'amphotéricine B est principalement utilisée pour les infections cutanées. Pour réduire les effets secondaires liés à son administration intraveineuse, elle est souvent combinée à des liposomes ou à d'autres formulations lipidiques. En plus de l'amphotéricine B, la nystatine, un autre composé polyénique antifongique, est utilisée en clinique. Décrite pour la première fois par Hazen et Brown (1950) comme produite par *Streptomyces noursei*, elle agit de manière similaire à l'amphotéricine B. Jusqu'à présent, aucune résistance n'a été observée contre ces composés. La nystatine est principalement utilisée en prophylaxie chez les personnes immunodéprimées à risque élevé d'infections fongiques, telles que les patients atteints du SIDA ou ceux recevant une chimiothérapie contre le cancer. Elle est également couramment utilisée comme antifongique en laboratoire. Plusieurs approches ont été développées pour créer des inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi cellulaire spécifiquement destinés à lutter contre les infections fongiques. La plupart de ces inhibiteurs, comme les candines, sont des produits fongiques, bien que des inhibiteurs de la biosynthèse des sphingolipides aient été découverts dans des extraits d'Actinobactéries telles que la rustmicine et la galbonolide, deux macrolides dépourvus de fraction sucrée (**Vicente et al., 2003**).

### 7.2.2. Agents antiviraux

Certains antibiotiques issus des Actinobactéries présentent également une activité contre les virus. Parmi eux, la kanamycine et l'hygromycine agissent sur les orthomyxovirus, tandis que la novobiocine et la daunomycine ciblent les herpèsvirus. D'autres antibiotiques tels que la pepstatine, l'amphotéricine et la doxorubicine sont efficaces contre les rétrovirus, notamment le VIH. Toutefois, ces substances ne sont pas considérées comme des options importantes pour le traitement clinique des infections virales (**Takeshima 1992**). À ce jour, l'acyclovir, un composé synthétisé chimiquement, ainsi que certains analogues de désoxynucléotides, restent parmi les antiviraux les plus importants. Récemment, un nouveau groupe de l'antibiotique produits par une espèce d'*Actinomadura* suscite un intérêt croissant en tant que composés antiviraux. L'histoire particulière de ces composés, qui reflète le processus non linéaire de développement dans les sociétés pharmaceutiques.

### 7.2.3. Agents Antitumoraux

#### a. Cytostatiques (inhibiteur des cellules)

L'actinomycine fut la première substance isolée lors des programmes de criblage initiaux dans le laboratoire de Waksman en 1940. Le micro-organisme producteur de cet antibiotique polypeptidique est le *Streptomyces antibioticus* subsp. *Antibioticus* (autrefois *Actinomyces antibioticus*) (**Waksman et Woodruff, 1940**). Malgré son activité intéressante contre une large gamme de bactéries, y compris la tuberculose, le composé s'est avéré trop toxique pour être utilisé en thérapie antibactérienne chez l'homme (**Waksman et Woodruff, 1941**). L'actinomycine D, un produit du *Streptomyces parvulus*, fut également le premier antibiotique à démontrer une activité anticancéreuse et reste aujourd'hui utilisé dans la thérapie antitumorale. Ce composé s'intercale avec l'ADN et inhibe l'ouverture de l'hélice double. À des doses plus faibles, l'actinomycine D agit en tant qu'inhibiteur de la synthèse d'ARN dépendante de l'ADN en s'intercalant avec les nucléotides guanine de l'ADN. La phénoxazinone asymétrique joue un rôle crucial dans cette intercalation en se liant de manière sélective aux zones riches en guanine et cytosine de l'ADN. Commercialisée sous le nom de Lyovac-Cosmegen® de MSD en tant que thérapeutique anticancéreuse, l'actinomycine D est un outil essentiel en biologie moléculaire et cellulaire en raison de son mode d'action (**Hollstein, 1974**).

#### b. Toxines bactériennes pour les Immun- conjugués

Les composés hautement toxiques suscitent à nouveau l'intérêt des sociétés pharmaceutiques en tant que thérapeutiques anticancéreuses, en se basant sur la technique de combiner les toxines avec des anticorps spécifiques. Les anticorps porteurs de toxines se lient

à un antigène sur la cellule cible, l'immunotoxine pénètre dans la cellule, et le composé actif (la toxine) élimine la tumeur (**Galm *et al.*, 2005**).

### **7.3.Impact des Actinobactéries sur la préservation de l'environnement**

Les Actinobactéries sont impliquées dans la biodiversité métabolique des écosystèmes marins, offrant des capacités métaboliques variées qui peuvent être bénéfiques pour l'équilibre écologique des milieux aquatiques. Par exemple, ces micro-organismes peuvent jouer un rôle essentiel dans le traitement des eaux polluées en dégradant les déchets organiques, contribuant ainsi à la purification de l'eau et à la prévention de la pollution des cours d'eau ; ainsi qu'ils sont très importants pour les phénomènes de la biodégradation et la transformation de la matière organique. Ils peuvent dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries, tel que les polymères complexes, des polysaccharides, de la chitine et des lignocelluloses, (**Lechevalier, 1981**), (**Goodfellow et Williams, 1983**), (**Goodfellow *et al.*, 1984**). Et possèdent un autre rôle ils ont un potentiel enzymatique riche qui joue un rôle important dans la fertilité des sols et ont la capacité aussi de dégrader la biomasse et de décomposer des résidus agricoles ou en milieu urbain (**Goodfellow *et al.*, 1984**). Les Actinobactéries sont également utilisés dans la fabrication de médicaments en raison de leurs propriétés antagonistes. La lutte biologique contre les maladies végétales (**Sutthinan, 2009**). En plus ils protègent les racines des plantes contre les invasions des champignons. Elles sont capables aussi de dégrader ou de recycler les toxines produites par des champignons toxigènes et par la suite ont été réduites les teneurs dans les produits fins aux agro-alimentaire (**Lamari, 2006**). Le genre *Frankia* est bien connu en foresterie pour son rôle dans la fixation d'azote. Les nodules racinaires de certains arbres dicotylédones contiennent une atmosphère en symbiose (**Lechevalier, 1981**).

**Chapitre 2 : « Approches  
conventionnelles d'isolement des  
actinobactéries »**

## 1. Approches conventionnelles d'isolement des actinobactéries

Les méthodes d'isolement des actinobactéries impliquent plusieurs étapes clés. Initialement, le processus se concentre sur l'isolement sélectif des actinobactéries de divers environnements, tels que les écosystèmes terrestres, le lacustre, l'océan, les plantes et les animaux. L'isolement des actinobactéries a généralement trois objectifs :

### 1. Étude de la communauté des actinobactéries :

- Pour cette première cible, il est essentiel d'isoler et d'identifier tous les actinobactéries en tant que cultures pures dans un environnement spécifique.
- Les milieux d'isolement utilisés doivent favoriser la croissance des actinobactéries tout en empêchant le développement d'autres microbes.
- Il est recommandé d'utiliser trois à cinq milieux différents avec des compositions variées, incluant des inhibiteurs contre les bactéries à Gram négatif et les champignons.

### 2. Isolement des actinobactéries spécifiques :

- Cette deuxième cible vise à isoler des actinobactéries particuliers, tels qu'une espèce ou un genre connu, ou ceux présentant des caractéristiques physiologiques spécifiques comme la résistance à divers agents.
- Les milieux d'isolement doivent être adaptés aux besoins des actinobactéries ciblés tout en limitant la croissance des microbes indésirables. Par exemple, pour isoler des actinobactéries halophyles et alcalophyles, des concentrations de sel spécifiques et un pH ajusté sont nécessaires.

### 3. Isolement des actinobactéries inconnus :

- La troisième cible, la plus complexe et cruciale, consiste à isoler des actinobactéries dont l'identification est inconnue.
- Cette tâche exige une expertise approfondie en physiologie et taxonomie des actinobactéries, ainsi qu'une compréhension des facteurs d'isolement tels que la composition des milieux, le pH, les inhibiteurs, la température, etc.
- Les chercheurs doivent accumuler une expérience significative et continuellement améliorer leurs méthodes d'isolement pour progresser dans la découverte des actinobactéries inconnus.

En somme, l'isolement des actinobactéries est un processus continu qui requiert une connaissance approfondie, une expertise technique et une persévérance pour explorer et découvrir la diversité de ces micro-organismes fascinants.

### 1.1. Prélèvement des échantillons à partir des différents habitats

La réussite d'isolement d'un grand nombre d'isolats d'actinobactéries peut être grandement influencée par le choix des échantillons environnementaux. Des échantillons de sol doivent être prélevés dans un espace vierge, à savoir la forêt primitive, les sols salins, les sols alcalins et le désert. En ce qui concerne le prélèvement à partir des sols, un échantillon de sol de 5 à 20 cm de profondeur est prélevé et placé dans du papier stérile ou un sac en plastique.

Tandis que, le prélèvement à partir des océans, se fait par l'échantillonneur, est utilisé pour recueillir le sédiment des grands fonds marins, puis les échantillons sont placés dans une bouteille en verre stérilisé et conservés à une température de 4 °C.

Les actinobactéries colonisent également les végétaux. Afin de les isoler, on prélève des morceaux frais de divers tissus végétaux et on les place immédiatement dans des récipients stériles. Les échantillons frais devraient être utilisés dès que possible pour l'isolement des actinobactéries.

On peut aussi prélever les actinobactéries à partir de fèces animales (**Mohamed *et al.*, 2014**). Afin d'isoler les actinomycètes, les échantillons fécaux frais doivent être placés dans un récipient stérilisé, conservés à 4 °C et utilisés pour l'isolement des actinobactéries dès que possible.

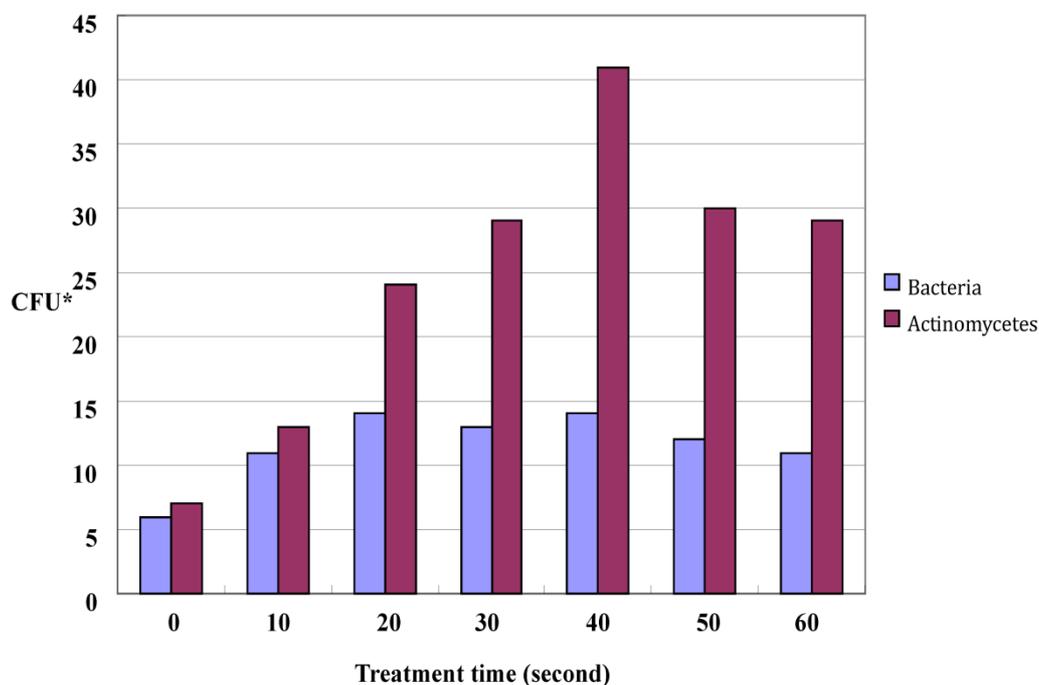
### 1.2. Prétraitement des échantillons d'essai

Le prétraitement est une étape importante dans l'isolement et l'identification des actinobactéries. Il vise à réduire la flore bactérienne indésirable et à favoriser l'isolement des actinobactéries souhaitées. Différentes méthodes de prétraitement chimique et physique ont été employées afin d'isoler les actinobactéries. Les spores des actinobactéries ont une plus grande résistance à la dessiccation que la plupart des bactéries. Par conséquent, le simple séchage des sols, des sédiments, des lichens et des échantillons fécaux à température ambiante éliminera la majorité des bactéries indésirables à Gram négatif, qui pourraient autrement dépasser les plaques d'isolement. On peut utiliser le traitement chauffé du sol séché à l'air ou des suspensions de sol chauffé pour isoler sélectivement des taxons actinobactérienne spécifiques. (**Tableau 5**)

**Tableau 5** : Prétraitements thermiques sélectifs pour l'isolement des actinobactéries. (Jiang *et al.*, 2016).

<b>Prétraitement</b>	<b>Objectif</b>
Sol séché à l'air chauffé à 120 C° pendant une heure	<i>Microbispore</i> <i>Streptosporangium</i> .
<b>Prétraitement</b>	<b>Objectif</b>
Sol séché à l'air chauffé à 100 C° pendant 15 min	<i>Actinomadura</i> spp.
Suspensions d'eau ou de sol chauffées à 45 C° ou à 50 C° pendant 10 min	<i>Streptomyces</i> spp.
Suspensions d'eau ou de sol chauffées à 60 C° pendant 30 min	<i>Micromonospora</i> spp.
Sol séché à l'air chauffé à 120 C° pendant une heure	<i>Dactylosporangium</i> et <i>Streptosporangium</i> spp.
Sol séché à l'air chauffé à 28 C° pendant une semaine	<i>Herbidospora crète</i>
Suspension de sol chauffée à 110 C° pendant une heure	<i>Microtétraspota glauca</i>

Les échantillons en suspensions peuvent être traités à l'aide d'ondes à ultrasons à une puissance de 180 W pendant une durée de 40 minutes. Les saprophytes fixés par le granulé du sol peuvent être libérés dans la suspension, ce qui entraîne une augmentation du nombre d'actinobactéries et une diminution des bactéries dans l'échantillon (Jiang *et al.*, 2010) (Figure 15).



**Figure 15 :** Influence du traitement par ondes ultrasonores par l'UFC entre les actinomycètes et d'autres bactéries. Unités de formation de colonies d'UFC. (Jiang *et al.*, 2016).

On a utilisé aussi des différents produits chimiques pour isoler des actinobactéries, tels que le chlorure de benzethonium, le gluconate de chlorhexidine, le phénol, la SDS et divers antibiotiques. L'utilisation de ces agents pendant une durée de 30 minutes à une température de 30 °C peut entraîner la mort des cellules à Gram négatif de bacilles et les pseudomonas aérobies, la formation d'endospores, l'augmentation de la fréquence de l'actinobactérie et la diminution des bactéries (**Tableau 6**).

Ces prétraitements sont essentiels pour obtenir des résultats précis et fiables dans l'isolement et l'identification des actinobactéries.

**Tableau 6** : Prétraitement chimique pour l'isolement des actinobactéries. (Jiang *et al.*, 2016).

Prétraitement	UFC ( $10^5$ /g)			
	Actinobactéries		Bactéries	
Contrôle	117	100 %	152	100 %
YE, 2 %	192	164%	169	110%
HA, 2 %	183	156 %	92	60 %
CA, 1 %	170	145 %	165	109%
VA, 0,2%	159	136%	178	117 %
ME, 0,2 %	163	139%	136	87 %
SDS, 0,05 %	152	157%	10	7 %
SMD et EE, 6 %	183	157%	22	14 %
SDS et HA, 1 %	173	148%	9	5 %
SDD et CA, 1,5 %	153	131 %	15	9%
SDD : VA, 0,6 %	147	126%	19	12 %
SDD et ME, 0,2%	158	13,5 %	14	8 %

YE : extrait de levure ; HA : acide humique ; CA : hydrolysate d'abéine ; VA : valine ; SDS : dodécylsulfate de sodium ; ME : mercapto-éthanol.

### 1.3. Méthodes d'isolement des actinobactéries de différents habitats

#### 1.3.1. Isolement des actinobactéries thermophiles

Pour l'isolement des actinobactéries thermophiles, il faut faire un séchage des échantillons provenant de sources chaudes ou d'environnements chauds à l'air pendant 7 à 10 jours, puis on les a traités à 120 C° pendant 1 heure.

Les milieux d'isolement utilisés en générale sont des milieux très riches tels que le milieu YIM 14 (Czapek amélioré), le milieu YIM 17 (asparagine glycérol) et le milieu (YIM 21) farine d'avoine (Annexe 1). Cinquante milligrammes de dichromate de potassium et 1 mg de pénicilline sont ajoutés dans les milieux d'isolement, pour inhiber les microorganismes indésirables et rendre les milieux de culture sélectifs.

Dans le but d'isoler les actinobactéries, la méthode de dilution décimale est souvent utilisée à partir des échantillons collectés. Un volume de 0,1 à 0,2 ml de chaque échantillon (à partir des dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) sont utilisés pour ensemer les boîtes de pétri contenant les

milieux spécifiques. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées pendant 7 jours dans une chambre humide à 55°C. Une seule colonie d'actinobactéries est prélevée pour inoculer une gélose inclinée contenant le même milieu d'isolement.

### 1.3.2. Isolement des actinobactéries halophiles et alcalophiles

Les milieux de culture utilisés pour isoler les actinobactéries halophiles sont en générale le milieu YIM 6 amidon-caséine, le milieu YIM 17 Milieu asparagine glycérol, le milieu YIM 47 Milieu d'extraits de sol, le Milieu T3 (**Jiang *et al.*, 2011**) et enfin le Milieu Horikoshi (**Horikoshi et Grant, 1989**) (Annexe1).

Afin d'isoler les actinobactéries alcalophiles, les cinq milieux ci-dessus peuvent être utilisés. Et le pH de ces derniers, doit être ajusté entre 10 et 11 et 25 à 40 mg (pour 1 L de milieu) d'acide nalidixique doivent être ajoutés à tous les milieux pour inhiber les bactéries Gram-négatives.

La croissance des actinobactéries halophiles est toujours très lente. Ainsi, les milieux d'isolement doivent être en couche épaisse et la durée d'incubation doit être allongée à 20 à 35 jours pour conserver l'humidité.

### 1.3.3. Isolement des actinobactéries acidophiles

Les études sur les actinobactéries acidophiles sont peu nombreuses dans le monde et il existe seulement quelques rapports sur les streptomycètes acidophiles. L'isolement de cet actinobactérie est difficile en raison de la croissance rapide de champignons et d'autres bactéries dans les échantillons testés sur les boîtes d'isolement avec un pH plus faible. Les milieux YIM 6, YIM 17, YIM 21 et YIM 47 (**annexe1**) peuvent être utilisés pour isoler les actinobactéries acidophiles. Le pH des milieux de culture doit être ajusté entre 4,0 et 4,5. Tous les milieux sont complétés par des mélanges stérilisés sur filtre [50 mg de cycloheximide + 50 mg de nystatine + 20 mg d'acide nalidixique ou 50 mg de dichromate de potassium stérilisé ( $K_2Cr_2O_7$ )].

### 1.3.4. Isolement des actinobactéries endophytes végétales

Milieu d'isolement utilisées sont le milieu d'extrait de levure d'eau (Crawford *et al.*, 1993), le milieu de propionate de sodium (**Gauze *et al.*, 1983**) et le milieu HV YIM 7 (**Hayakawa et Nonomura, 2016**). Il faut ajouter pour chaque milieu : 50 à 100 mg de cycloheximide, 100 mg de nystatine, 25 mg d'acide nalidixique et 5 mg de pénicilline pour 1000 ml.

Les échantillons sont séchés à l'air pendant 48 h à température ambiante, puis lavés par une étape ultrasonique (160 W, 15 min) pour éliminer complètement les sols de surface et les épiphytes adhérents. Après séchage, les échantillons sont soumis à une procédure de stérilisation de surface du matériel végétal en cinq étapes : lavage de 4 à 10 minutes dans du NaOCl à 5 %, suivi d'un lavage de 10 minutes dans du Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> à 2,5 %, lavage de 5 minutes dans de l'éthanol à 75 %, lavage dans eau stérile et rinçage final dans 10 % NaHCO<sub>3</sub> pendant 10 min. Après avoir été soigneusement séchés dans des conditions stériles, les tissus stérilisés en surface ont été soumis à un séchage continu à 100 °C pendant 15 min. Les tissus traités en surface sont émiettés de manière aseptique en petits fragments et homogénéisés avec un homogénéisateur en verre ; 0,1 ml de la suspension à trois dilutions est étalé sur la surface des milieux d'isolement. Les boîtes ainsi inoculées sont incubées à 28°C pendant 2 à 4 semaines.

### 1.3.5. Isolement des actinobactéries à partir des excréments d'animaux

Les milieux utilisés pour l'isolement des actinobactéries à partir des excréments d'animaux sont le milieu YIM 7 HV, le milieu aux extraits de sol YIM 47, le milieu amélioré glycérol-asparagine YIM 171, le milieu mycose-proline YIM 212, et le milieu amélioré amidon-caséine YIM 601 (**annexe1**).

Le prélèvement se fait à partir des échantillons fécaux frais. Les échantillons sont immédiatement transférés dans des plats en verre stériles et séchés pendant 10 jours à une température de 28°C. Deux grammes de chaque échantillon séché ont été prétraités à 80°C pendant une heure, puis dissous dans 18 ml d'eau stérile contenant 0,1% de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, puis agité à 220 rpm/min pendant 60 minutes. La suspension est traitée aux ultrasons pendant 40 secondes à 150 W avant enrobage. La suspension est diluée de 10<sup>-1</sup> jusqu' à 10<sup>-7</sup>, les trois dilutions 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-7</sup>, sont les plus souvent utilisées pour isoler les actinobactéries.

Les bactéries Gram négatives présentes dans les matières fécales animales constituent un obstacle majeur pour l'identification des actinobactéries fécales. Pour exclure les bactéries Gram-négatives et les champignons et obtenir plus d'actinobactéries inconnues, il est important de prendre en compte certains aspects essentiels de l'échantillonnage et de l'isolement.

Tout d'abord, en se basant sur les résultats des expériences précédentes, il est recommandé de prendre des échantillons fécaux frais d'animaux sauvages vivant dans leur milieu naturel. Ensuite, les échantillons frais doivent être séchés à une température de 25-28°C pendant une période de 7 à 10 jours. Ensuite, il est nécessaire de traiter les échantillons séchés pendant 60 minutes à une température de 80°C, tandis que la suspension fécale doit être soumise

à un traitement par ultrasons pendant 40 secondes à une puissance de 150 W avant d'être enrobée. Ensuite, il est nécessaire d'ajouter au milieu d'isolement 50 mg de bichromate de potassium et 5 mg de pénicilline ou 50 mg de nystatine, 20 mg d'acide nalidixique et 5 mg de pénicilline par 1 L afin d'empêcher la prolifération des bactéries Gram négatives et des champignons. Après, il est nécessaire de diluer les échantillons à des concentrations de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ , et il est important de déterminer à l'avance la concentration de dilution optimale pour chaque échantillon de matières fécales animales. Ensuite, les milieux YIM 212, YIM 171 et HV sont plus efficaces pour l'isolement des actinobactéries fécales, et il est nécessaire d'améliorer et de les mettre à jour régulièrement en fonction des différents échantillons. Ensuite, il est essentiel que toutes les expériences soient menées dans des conditions rigoureuses d'asepsie pour prévenir la propagation de pathogènes.

### 1.3.6. Isolement des actinobactéries associées aux lichens

Les milieux d'isolement des actinobactéries associées aux lichens sont les milieux : amidon-caséine YIM 6 et le milieu amélioré glycérol-asparagine YIM 171, le milieu aux polysaccharides de champignons YIM 709 et le milieu YIM 711 Caséine peptone de soja. **(Annexe1)**

Les inhibiteurs additionnés à tous les milieux pour agir comme inhibiteurs contre les champignons et les bactéries à Gram négatif stérilisés par filtration sont en général : 50 mg de cycloheximide, 50 mg de nystatine et 25 mg d'acide nalidixique.

Les actinobactéries sont isolées en utilisant la méthode des dilutions décimales. Au moyen d'un homogénéisateur en verre stérile, deux grammes de chaque échantillon séché sont broyés et dissous dans 18 ml d'eau stérile contenant 0,1% de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_5$ , puis agités à 220 rpm/min pendant 60 minutes. La suspension est traitée aux ultrasons pendant 40 s à une puissance de 150 W. La suspension est diluée de  $10^{-1}$  jusqu' à  $10^{-5}$ . Un volume de 0,1 ml de trois dilutions,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ , pour ensemercer les boîtes de pétri, qui sont ensuite incubées pendant 10 à 25 jours à une température de 28°C.

### 1.3.7. Isolement des actinobactéries rares

Les actinobactéries, à l'exception des streptomycètes, sont appelés actinobactéries rares. Au cours des dernières années, de nombreuses substances bioactives nouvelles ont été identifiées dans les actinomycètes rares. Les techniques d'isolement des actinobactéries rares ont donc suscité une grande curiosité.

## Chapitre 2 : « Méthodes conventionnelles d'isolement des actinobactéries »

Les milieux de culture de base utilisés pour isoler les actinobactéries rares sont : le milieu YIM 7 HV, le milieu YIM 212 histidine-raffinose, le milieu oligotrophe, le milieu minimal.

Des sources spéciales de carbone ou d'azote peuvent être utilisés, pour substituer les sources habituelles comme la chitine, lignine, xylane, méthanol, propionate, kératine, lait de coco et acides aminés spéciaux, etc.

Il est possible d'utiliser différents produits chimiques ou antibiotiques (**Tableau 7**) pour isoler sélectivement divers actinobactéries rares. Par exemple, la leucomycine peut être employée pour isoler sélectivement les membres d'*Actinomadura* et de *Streptosporangium*, tandis que la tunicamycine peut être utilisée pour *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* et *Micromonospora*.

La combinaison du prétraitement chimique et de différents milieux permet d'isoler différents actinobactéries rares. Par exemple, le milieu HV avec un traitement à la chloramine T permet d'isoler les membres de *Herbidospora*, *Microbispora*, *Microtetraspora* et *Streptosporangium* (**Tableau 8**).

**Tableau 7** : Produits chimiques sélectifs pour l'isolement des actinobactéries rares. (**Jiang et al., 2016**).

Produits chimiques	Genres cibles	Produits chimiques	Genres cibles
Bruneomycine	<i>Actinomadura</i>	Benzoate	<i>Micromonospora</i>
Streptomycine	<i>Actinomadura</i>	Polymyxine	<i>Streptomyces</i>
Gentamicine	<i>Actinomadura</i>	Kanamycine	<i>Microtétraspore</i>
	<i>Streptosporangium</i>	Acide nalidixique	<i>Microtétraspore</i>
Leucomycine	<i>Streptosporangium</i>	Nofloxacine	<i>Microtétraspore</i>
Fradiomycine	<i>Actinokineospora</i>	Pénicilline	<i>Saccharothrix</i>
Kanamycine	<i>Actinokineospora</i>	Sulfate de néomycine	<i>Amycolatopsis</i>
	<i>Thermomonospora</i>	Lysozyme	<i>Streptoverticilium</i>
Acide nalidixique	<i>Actinokineospora</i>	Novobiocine	<i>Glycomyces</i>
Triméthoprime	<i>Actinokineospora</i>	Streptomycine	<i>Glycomyces</i>

**Tableau 8** : Produits chimiques sélectifs pour l'isolement des actinobactéries rares, (Jiang et al., 2016). (Suite tableau 7)

Tellurite	<i>Actinoplanes</i>	Lincomycine	<i>Micromonospora</i>
Tunicamycine	<i>Actinoplanes</i>	Novobiocine (25 C°)	<i>Micromonospora</i>
	<i>Dactylosporangium</i>	Novobiocine (50 C°)	<i>Thermomonospora</i>
	<i>Micromonospora</i>	Oxytétracycline	<i>Streptoverticilium</i>
Rifampicine (30 C°)	<i>Actinomadura</i>	Rubomycine	<i>Actinomadura</i>
Rifampicine (50 C°)	<i>Saccharomonospora</i>	Tétracyclines	<i>Nocardia</i>

**Tableau 9** : Méthodes de combinaison pour l'isolement d'actinobactéries rares. (Jiang et al., 2016).

Traitement chimique	Genres cibles
Phénol, chlorure de benzéthène et gluconate de chlorhexidine	<i>Microbispora</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptosporangium</i>
Composés d'ammonium quaternaire	<i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i>
<b>Antibiotiques</b>	
Acide nalidixique, pénicilline G	<i>Rhodococcus</i>
Kanamycine, acide nalidixique, triméthoprime	<i>Actinokineospora</i>
Gentamicine	<i>Streptosporangium</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Micromonospora</i>
Novobiocine	<i>Actinoplanes</i> , <i>Thermoactinomyces</i>
Pénicilline, acide nalidixique	<i>Saccharothrix</i>
Rifampicine, Streptomycine, Kanamycine	<i>Actinomadura</i>
Tunicamycine	<i>Micromonospora</i>
<b>Milieu d'isolement</b>	
Agar de vitamine HV (Agare HV) avec traitement par chloramine T	<i>Herbidospira</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtétraspota</i> , <i>Streptosporangium</i>
Hydrolysate de cheveux vitamine agar	<i>Herbidospira</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtétraspota</i> , <i>Streptosporangium</i>
Agar HV contenant de l'acide nalidixique avec SDS et traitement à l'extrait de levure	<i>Actinomadura</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Microtétraspota</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Nocardia</i>

# **Chapitre 3 : « Méthodes préliminaires d'identification des Actinobactéries »**

## 1. Méthodes d'identification des Actinobactéries

### 1.1. La description des colonies et la formation du pigment mélanoïdes

Les milieux standards pour la description des colonies est le milieu complexe 5006 (ANNEXE 1). Les deux derniers milieux ont également été utilisés avec le milieu synthétique Suter 5337 (ANNEXE 1) avec et sans tyrosine (Kutzner, 1986), pour la détection de la formation de pigment mélanoïdes. Les boîtes de pétrie sont incubées pendant 10 à 14 jours à 28°C, dans une chambre humide pour éviter le rétrécissement de la gélose.

Pour la description des souches, quatre paramètres ont été utilisés :

#### 1.1.1. Croissance (G)

La distinction entre une bonne croissance, une croissance clairsemée et une absence de croissance (aucune).

#### 1.1.2. Couleur inversée (R)

Il s'agit de noter la couleur du mycélium substrat, qui est souvent influencée par la formation d'un pigment soluble. La couleur est caractérisée à l'aide du Code RAL (Reichsausschub F *et al.*, 1990).

Il est souvent impossible de trouver la couleur de la carte qui est 100% identique à la couleur de la souche, mais ce code est une référence simple pour la détermination et la reconnaissance de la couleur. En plus de la couleur RAL d'une variété peut être incolore.

#### 1.1.3. Mycélium aérien (A)

Dans le cas où il y a présence mycélium aérien, on distingue une bonne croissance clairsemée. Lorsque le mycélium aérien est bien développé, la couleur est décrite à l'aide du code couleur RAL.

#### 1.1.4. Pigment Soluble (S)

Si un pigment soluble est produit, il est également décrit à l'aide du code de la couleur RAL (Figure 16)



Figure 16 : Le code de la couleur RAL (<https://vestre.com/ral-classic-colour-chart>).

## 2. Tests physiologiques

### 2.1. Résistance au chlorure de sodium (Kutzner 1981)

La résistance au chlorure de sodium est un outil utile pour différencier les espèces d'actinobactéries, pas seulement pour différencier les actinobactéries marines ou halophiles.

Comme pour la croissance sur les milieux ISP, la croissance sur milieu basal 5339 (ANNEXE 1) additionné de 0, 2,5, 5, 7,5 et 10 % de chlorure de sodium est estimée. Après cinq à dix jours d'incubation, la concentration la plus élevée de sel permettant la croissance est enregistrée.

### 2.2. Résistance au lysozyme (Kutzner 1981)

Les cellules Gram positives sont en principe sensibles au lysozyme. En raison de couches supplémentaires comme les acides teichoniques ou de modifications de la molécule de peptidoglycane, certaines bactéries Gram-positives sont devenues résistantes au lysozyme. Il en va de même pour *Mycobacterium*, *Nocardia* et « *Streptovercillium* » résistants au lysozyme, la plupart des espèces de *Streptomyces* sont sensibles.

Comme la résistance au chlorure de sodium, la résistance au lysozyme peut être identifiée par une technique de microplaque. Selon Kutzner et al (1978). La solution stock de lysozyme est préparée et stériliser par filtration, ensuite ajouté au milieu de base en surfusion.

Les concentrations préparées sont en générale 0, 10, 25, 50, 75 et 100 µg/ml de lysozyme. Cette évaluation a été effectuée comme la tolérance au chlorure de sodium.

#### 2.3. Teneur en pH (Kutzner 1981)

Ce paramètre physiologique est testé dans des tubes avec du milieu 5265 (ISP2) (ANNEXE 1) avec des pH de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10. Après incubation la croissance est estimée sur la surface de gélose inclinée. Ou dans le cas d'utilisation du milieu ISP2 liquide la densité optique est mesurée dans chaque tube.

#### 2.4. Utilisation des hydrates de Carbone

L'utilisation de sources de carbone joue un rôle important dans la différenciation des espèces par les bactéries et donc également par les Actinobactéries (Benedickt *et al.*, 1955).

La capacité des souches à utiliser 10 composés est testée en technique microplaque (12 puits) basée sur la méthode de Shirling et Gottlieb (1966) avec la gélose basale 5338 (ANNEXE 1). Les sources de carbone utilisées sont (Glucose, Arabinose, Saccharose, Xylose, Inositol, Mannitol, Fructose, Rhamnose, Raffinose et Cellulose). Les solutions stock à 10 % des sucres, sont stérilisées par filtration et ajoutées au milieu de base 5338 après autoclavage et refroidissement à 45°C. La concentration finale de chaque sucre dans le milieu doit être 1%.

Les boîtes contenant le milieu additionné du glucose servent de contrôle positif et les boîtes avec milieu basal pur et eau sont considérées comme contrôle négatif.

L'évaluation est réalisée selon le schéma suivant :

- La croissance n'est pas meilleure que le contrôle négatif -
- La croissance meilleure comme le contrôle négatif mais pas comme le contrôle positif (+)
- Croissance comme le contrôle positif +
- Croissance meilleure comme le contrôle positif ++

#### 2.5. Les empreintes physiologiques avec les bandes api

Le laboratoire BioMérieux propose un certain nombre de galeries d'identification miniaturisées différentes qui contiennent différents tests. Trois d'entre eux sont utilisés dans la description de routine des Actinobactéries.

- L'api Coryne (**Figure 17**), un test illustré dans le (**Tableau 9**). Utilisé pour la caractérisation des *Propionibacterineae*, *Micrococcineae* et *Corynebacterinae* (**MacFaddin 1980**).



**Figure 17** : la galerie api coryne (<http://www.microbes-edu.org/professionnel/observations/obs18/J12/index.html>).

**Tableau 10** : Les tests de la galerie api coryne (**Wink, 2015**)

Test	Réaction
Nit	Réduction des nitrates
Pyz	Pyrazinamidase
PyrA	Pyrrolidonyl Arylamidase
Pal	Phosphatase alcaline
β Gur	Bêta Glucuronidase
β Gal	Bêta Galactosidase
α Glu	Alpha Glucosidase
β Nag	Beta Glucosamidase
Esc	Esculine (bêta Glucosidase)
Ure	Uréase
Gel	Gélatine (hydrolyse)
Glu	Fermentation du glucose
Rib	Fermentation du ribose
Xyl	Fermentation du xylose
Man	Fermentation du mannitol
Lac	Fermentation du lactose
Sac	Fermentation du saccharose
Glyg	Fermentation du glycogène

- L'api Zym (**Figure 18**) ; un système simple et rapide pour la détection des enzymes bactériennes (**Humble et al. 1977**) qui a été utilisé avec succès pour l'identification des *Actinomycetaceae* et des bactéries apparentées (**Kilian 1978**), illustré dans le (**Tableau 11**).

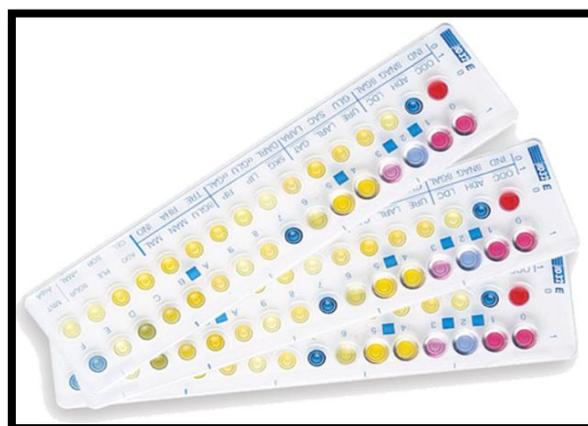
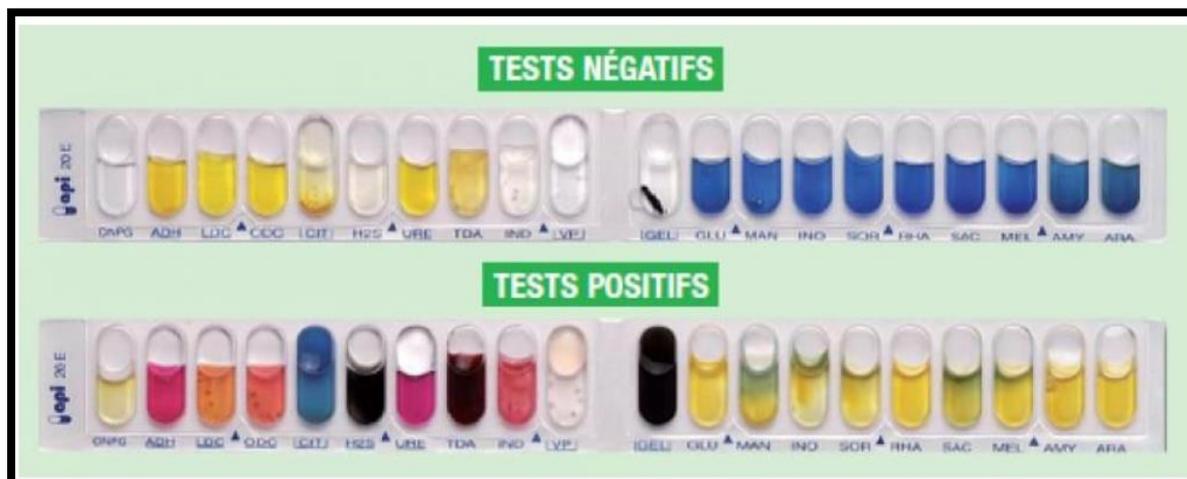


Figure 18 : la galerie api Zym (<https://www.meditray.co.nz/laboratory/shop/molecular-and-microbiology-reagents/microbiology-reagents/api-kits-and-reagents/api-zym/>).

Tableau 11 : les enzymes testés de la galerie api Zym (Wink, 2015).

Enzyme testée	Substrat
Phosphatase alcaline	2-naphtylphosphate
Estérase (C 4)	2-naphtyl butyrate
Estérase Lipase (C 8)	2-naphtyl caprylate
Lipase (C 14)	Myristate de 2-naphtyle
Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphtylamide
Valine arylamidase	L-valyl-2-naphtylamide
Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphtylamide
Trypsine	N-benzoyl-DL-arginine-2- naphtylamide
Chymotrypsine	N-glutaryl-phénylalanine-2-naphtylamide
Acide Phosphatase	2-naphtylphosphate
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-phosphate
$\alpha$ galactosidase	6-Br-2-naphtyl- $\alpha$ D-galactopyranoside
$\beta$ galactosidase	2-naphtyl- $\beta$ D-galactopyranoside
$\beta$ glucuronidase	Naphtol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronide
$\alpha$ glucosidase	2-naphtyl- $\alpha$ D-glucopyranoside
$\beta$ glucosidase	6-Br-2-naphtyl- $\beta$ D- glucopyranoside
N-acetyl- $\beta$ -glucoseamidase	1-naphthyl-N-acetyl- $\beta$ D-glucoseaminide
$\alpha$ mannosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-mannopyranoside
$\alpha$ fucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ L-fucopyranoside

- L'api 20 E (**Figure 19**) est une autre galerie d'identification miniaturisée des entérobactéries (**Smith et al. 1972**) qui pourrait également être utilisée pour l'empreinte de la physiologie des actinobactéries, (**Tableau 12**).



**Figure 19** : La galerie api 20 (<https://www.socimed.com/galeries-api-20e.html>).

**Tableau 12** : Les tests de la galerie api 20 (**Wink, 2015**).

Teste	Substrat	Réactions/Enzymes
Onp	Ortho-nitro-phényl-galactoside	Beta-galactosidase
Arg	Arginine	Arginine dihydrolase
Lys	Lysine	Lysine décarboxylase
Odc	Ornithine	Ornithine décarboxylase
Cit	Citrate de sodium	Utilisation du citrate
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H2S
Ure	Urée	Uréase
Trp	Tryptophane	Tryptophane désaminase
Ind	Tryptophane	Production d'indole
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne
Gel	Gélatine de Kohn	Gélatinase
Glu	Glucose	Fermentation
Man	Mannose	Fermentation
Ino	Inositol	Fermentation
Sor	Sorbitol	Fermentation
Rha	Rhamnose	Fermentation
Sac	Saccharose	Fermentation
Mel	Mélibiose	Fermentation
Amy	Amygdaline	Fermentation
Ara	Arabinose	Fermentation

## 2.6. La plaque Bio log

La microplaque Biolog GP2 (**Figure 20**) est conçue pour l'identification et la caractérisation d'une très large gamme de bactéries aérobies à Gram positif.

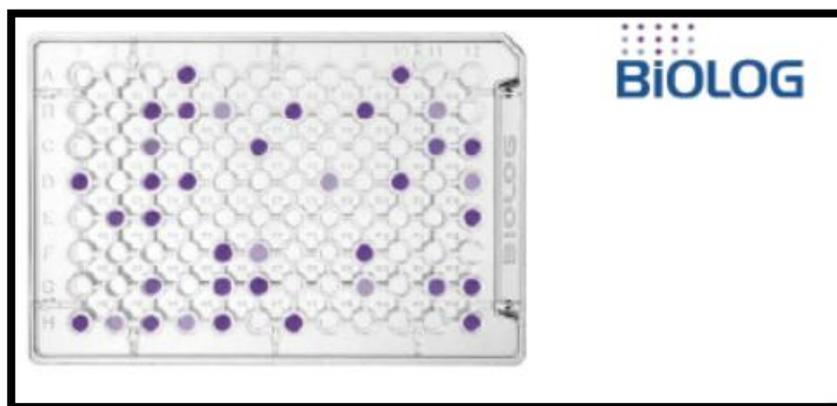
Les microplaques et les bases de données de Biolog ont été introduites pour la première fois en 1989, utilisant une nouvelle chimie redox brevetée. Cette chimie, basée sur la réduction du tétrazolium, répond au processus métabolique (c'est-à-dire la respiration) plutôt qu'aux sous-produits métaboliques (par exemple l'acide). La chimie de Biologs fonctionne comme un rapporteur universel du métabolisme et simplifie le processus de test car il n'est pas nécessaire d'ajouter des produits chimiques révélateurs de couleur. Étant donné que la microplaque GP2 ne dépend pas de la croissance pour produire des identifications, elle offre une capacité supérieure pour tous les types d'organismes à Gram positif : les Cocci, les bâtonnets et les bâtonnets sporulés sont tous identifiés avec un seul panneau. La base de données du GP2 Micro Plate compte désormais plus de 310 espèces. Il s'agit de loin de la plus grande base de données d'identification basée sur des kits disponible.

La Micro Plate Biolog GP2 effectue simultanément 95 tests et donne un modèle de réaction caractéristique appelé « empreinte métabolique ». Ces modèles de réaction d'empreintes digitales fournissent une grande quantité d'informations commodément contenues dans une seule Micro Plate Biolog. Les modèles d'empreintes métaboliques sont comparés et identifiés à l'aide du logiciel de base de données Micro Log TM.

D'autres méthodes d'identification basées sur des kits aérobies reposent sur un nombre beaucoup plus restreint de tests. Par conséquent, la limite importante de ces produits réside dans le nombre limité d'espèces et de types d'organismes qu'ils peuvent identifier. De plus, ces produits ont été conçus pour répondre aux besoins des tests cliniques/hospitaliers de routine. La Micro Plate Bio log GP2 a été conçue pour répondre aux besoins d'un éventail beaucoup plus large d'utilisateurs, notamment les laboratoires d'essais environnementaux et les laboratoires de maladies animales et végétales ainsi que les laboratoires de référence clinique.

Les souches sont incubées dans le milieu de culture 5006 à 28° et 37°C avec agitation. Les cultures sont diluées avec de l'eau et directement utilisées avec les Micro Plates GP2.

Les plaques résultantes sont numérisées (l'image est inversée) et lues avec un Spectrafluor de Texan.



**Figure 20** : la Micro Plates d'identification GP2 (<https://www.biosm indonesia.com/id/brand/detail-brand/250/an-anaerobes-microplate>).

## 2.7.Fiche technique de la souche

Sur la page suivante, un exemple de fiche technique de la souche de *Nesterenkonia aethiopica* est présenté, ici toutes les données des méthodes décrites précédemment sont renseignées. Le format et le type d'informations sont décrits dans chaque chapitre. Toutes les données des différentes espèces d'Actinobactéries sont ainsi complètement décrites. Dans le cas où un test n'a pas été effectué, il est marqué comme nd (non déterminé). Dans d'autres cas, les souches ne se sont pas non plus développées sur le milieu de base ou, sur la base de la production de couleur, il n'a pas été possible d'interpréter certains résultats API.

**Genre :** *Nesterenkonia* **FH 6773**  
**Espèce :** *aethiopica*  
**Numéros dans d'autres collections :** DSM 17773

**Morphologie :**

ISP 2	<b>G</b>	<b>R</b>
	Bon	Jaune de zinc
	A	SP
	Aucun	Aucun
ISP 3	<b>G</b>	<b>R</b>
	Bon	Jaune de zinc
	A	SP
	Aucun	Aucun
ISP 4	<b>G</b>	<b>R</b>
	Bon	Jaune de zinc
	A	SP
	Aucun	Aucun
ISP 5	<b>G</b>	<b>R</b>
	Bon	Jaune de zinc
	A	SP
	Aucun	Aucun
ISP 6	<b>G</b>	<b>R</b>
	Bon	Jaune de zinc
	A	SP
	Aucun	Aucun
ISP 7	<b>G</b>	<b>R</b>
	Bon	Jaune de zinc
	A	SP
	Aucun	Aucun

**Pigment Mélanoïde :** - - - -

**Résistance au Na Cl :** %

**Résistance aux Lysozymes :**

**pH :** Valeur- Optimal-

**Température :** Valeur- Optimal - 30 °C

**Utilisation du Carbone**

Glu Ara Suc Xyl Ino Man Fru Rha Raf Cel  
n.d

**Enzymes :**

2+	3+	4+	5+	6+	7(+)	8-	9-	10-	11+	
12-	13-	14-	15-	16-	17-	18-	19-	20-		
Nit	Pyz	Pyr	Pal	βGur	βGal	αGlu	βNag	Esc	Ure	Gel
-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
Glu	Rib	Xyl	Man	Mal	Lac	Sac	Glyg			
-	-	-	-	-	-	-	-			

**Commentaires :** .....

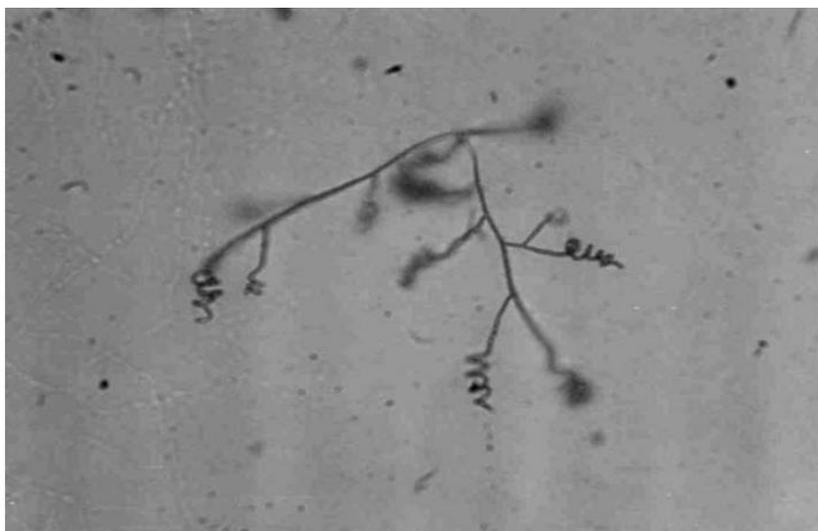
.....

### 3. Caractérisation au microscope optique

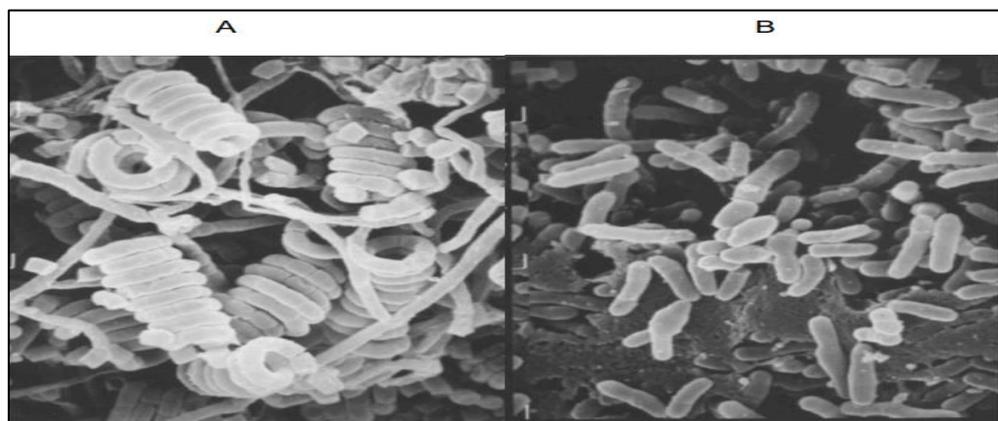
Pour les études au microscope optique des souches, un microscope Leitz Ortholux avec un objectif EF L32/0,40 et un objectif EF L20/0,32 est utilisé. Ces objectifs permettent de travailler avec une grande distance entre l'objectif et l'objet, de sorte que les boîtes de pétri contenant les cultures puissent être directement utilisées pour l'observation. Pour la microscopie optique, on utilise principalement des milieux à faible turbidité.

Les caractéristiques suivantes sont vérifiées :

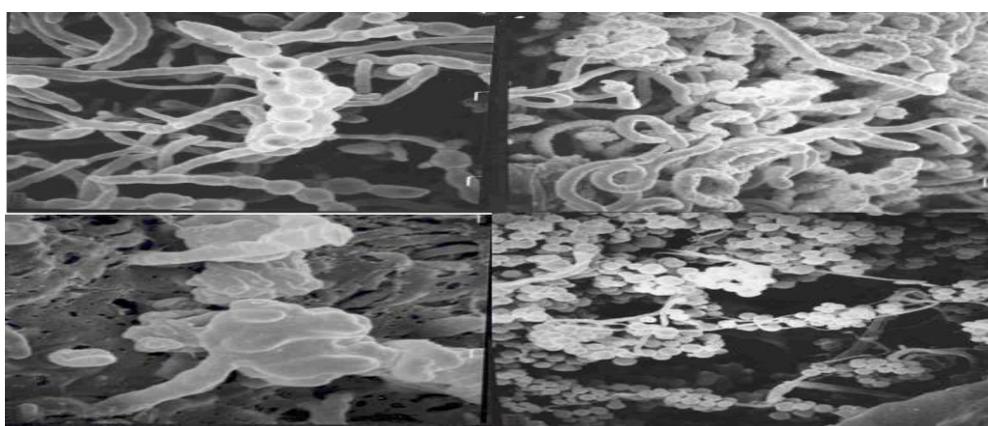
- ✓ Chaînes de spores oui ou non
- ✓ Sporangies oui ou non
- ✓ Spores uniques oui ou non
- ✓ Fragmentation du mycélium aérien ou substrat oui ou non
- ✓ Morphologie de la chaîne de spores Recti flexibilis, Retinaculum-apertum
- ✓ Spire, Verticille



**Figure 21** : Chaîne de spores en spirale d'*Actinomadura namibiensis*, grossissement x 350  
Microscopie électronique à balayage. (Wink, 2015).



**Figure 22 :** Microscopie électronique à balayage (Wink, 2015).



**Figure 23** Quelques exemples de chaînes de spores, de sporanges et de spores uniques en microscopie électronique à balayage (MEB) de différentes actinomycétales (Wink, 2015).

#### 4. Microscopie électronique à balayage

Les préparations des souches sont réalisées en utilisant une méthode modifiée de VOBIS et KOTHE (1985) décrite par (WINK, 1992). Les souches sont cultivées sur ISP 3 (5315) ou ISP 2 (5265) (ANNEXE 1) ou toute gélose spéciale nécessaire à la croissance et à la différenciation à 28°C (ou toute autre température requise) sur une période de 10 à 14 jours. Dans ces plaques, un morceau de 1 cm<sup>2</sup> est découpé et incubé dans une solution de glutaraldéhyde à 4 % dans l'eau pendant 24 heures ou plus. Après lavage à l'eau (cinq fois de 10 minutes chacun), les échantillons sont déshydratés par incubation dans du 2 méthylglycérol (trois fois de 10 minutes chacun). Le méthylglycérol est remplacé par de l'acétone sèche (trois fois de 10 minutes chacune) et les échantillons sont séchés à l'aide de CO<sub>2</sub>. Les échantillons sont fixés sur un cylindre en laiton et recouverts d'or grâce au système de pulvérisation cathodique. Cette méthode peut être utilisée pour toutes les souches qui forment un mycélium

stable et qui sont connectées à la gélose illustrée dans la figure de la page précédente (une espèce de *Streptomyces* avec des spores lisses en chaînes de spores en spirale).

Les souches qui se développent en cellules uniques, comme les bactéries corynéformes, sont fixées sur des plaques de verre recouvertes de lysine. Par conséquent, les échantillons fixés dans le glutaraldéhyde sont lavés pendant 10 minutes dans de l'éthanol à 30 %, puis pendant 10 minutes dans de l'éthanol à 60 % et enfin pendant 10 minutes dans de l'éthanol à 90 %. La suspension est décantée et les cellules sont transférées sur la plaque de lysine et séchées une minute à l'air. Ensuite, la plaque est lavée deux fois pendant 10 minutes dans de l'éthanol pur. Ces échantillons sont également séchés à l'aide de CO<sub>2</sub>, fixés sur des cylindres en laiton et recouverts d'or. **La figure (B)** de la page précédente montre les cellules uniques de *Corynebacterium glutamicum*.

Avec le SEM, il est possible d'obtenir de nombreuses informations sur les structures fines des souches, la morphologie des chaînes de spores, la surface des spores, la forme des sporanges et la formation de spores uniques. La surface des spores est lisse, verruqueuse, rugueuse, noueuse, poilue et épineuse.

Au cours de l'examen au microscope électronique à balayage, les échantillons peuvent être photographiés. Sur les images, le grossissement est représenté par une ligne de barres en haut de l'image et la taille d'une structure peut être déterminée à l'aide du schéma suivant :  
Grossissement au SEM x longueur D = Grossissement réel (D = longueur d'une unité de barre répétitive en haut de l'image).

## « Discussion générale »

## Discussion générale

L'isolement des actinobactéries est une étape cruciale pour leur étude et leur exploitation biotechnologique. Diverses méthodes soient classiques ou bien moléculaire sont utilisées pour isoler ces micro-organismes à partir de différents environnements (sol, eau, sédiments, etc.). Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients. En ce qui concerne la méthode de culture sur milieu sélectif ; cette méthode permet l'isolement des actinobactéries en impliquant des milieux de culture très riches et sélectifs (ex : milieu de Bennett, le milieu ISP 5, le milieu de culture AIA, etc.). Cette méthode conventionnelle est facile à mettre en œuvre et à standardiser et peu coûteuse. Elle permet d'obtenir des colonies isolées pour des études plus approfondies, tandis que certaines actinobactéries sont difficiles à cultiver ou ne peuvent pas être cultivées *in vitro*, en plus les milieux de culture déjà cité peuvent favoriser la croissance de micro-organismes contaminants non désirées à cause de leur richesse en nutriments. En plus, le temps de croissance des actinobactéries qui est relativement long, pouvant aller de quelques jours à plusieurs semaines (**Dietz et Mathews, 1970**).

L'utilisation de la méthode des dilutions en série qui est une technique simple et économique, réduit la densité de la population microbienne dans l'échantillon, facilitant ainsi l'isolement des colonies individuelles. Cependant, elle peut conduire à la perte de micro-organismes rares ou à faible densité, nécessitant une manipulation soignée pour éviter les contaminations et aussi (**Williams et Wellington, 1982**). Par opposition, les pré-traitements des échantillons (ex. : chauffage, traitement alcalin) ; se caractérise par la sélectivité accrue pour les actinobactéries, qui sont plus résistantes à certains traitements (chaleur, pH élevé) par rapport à d'autres bactéries et la réduction des contaminants indésirables mais elle porte le risque d'endommager ou de tuer certaines espèces d'actinobactéries sensibles, et peut également favoriser la croissance certaines espèces résistantes (**Hayakawa et Nonomura, 1987**).

L'utilisation des méthodes de filtration et de centrifugation, est préférable pour les échantillons d'eau ou de sédiments. Ces méthodes, permettent de séparer les actinobactéries des particules plus grosses ou des cellules plus petites et malgré tout ça elle peut être laborieux et nécessiter des équipements spécifiques. Dans cette méthode le risque de perte de micro-organismes durant les étapes de traitement est également présent (**Goodfellow et Fiedler, 2010**).

Tandis que, l'implication des méthodes moléculaire (ex. : PCR, métagénomique) permettent la détection et l'identification de bactéries cultivable et les bactéries non cultivables, et révèlent des informations sur la diversité microbienne dans un échantillon. Les approches moléculaires ont l'avantage d'être rapide et efficaces et cela grâce aux avancées technologiques.

## **Discussion générale**

Cependant, leur coût associé aux équipements et aux réactifs est élevé. En addition, ces méthodes ne permettent pas l'obtention des cultures vivantes qui sont généralement utilisées, pour les études fonctionnelles ou des applications biotechnologiques. Ces approches impliquent aussi une expertise en domaine de bio-informatique pour analyser les données (**Stackebrandt et Goebel, 1994**), (**Hugenholtz *et al.*, 1998**).

**« Conclusion et perspective »**

## Conclusion et perspectives

L'isolement des actinobactéries, requiert des méthodes spécifiques pour séparer ces microorganismes du reste de la flore bactérienne. Les méthodes conventionnelles d'isolement et d'identification des actinobactéries représentent un pilier fondamental de la microbiologie. Leur utilisation implique des procédures rigoureuses telles que l'isolement sur des milieux sélectifs et la réalisation des différents tests métaboliques. Permettent de récupérer et de caractériser ces microorganismes souvent précieux.

Malgré les défis posés par la récupération des actinobactéries moins courantes, ces méthodes offrent une gamme d'approches adaptatives, y compris l'utilisation de différents milieux et prétraitements spécifiques en fonction des habitats écologiques des échantillons de sols. Grâce à leur efficacité, ces techniques continuent de jouer un rôle crucial dans la recherche microbiologique, facilitant de nouvelles découvertes et ouvrant la voie à des applications importantes dans des domaines tels que la médecine, l'agriculture et la biotechnologie.

En analysant les données recueillies, plusieurs perspectives peuvent être proposées :

**Sélection des milieux de culture spécialisés en** développant les milieux de culture spécifiques pour favoriser la croissance des Actinobactéries rares ou difficiles à cultiver, en plus l'ajout de précurseurs de métabolites secondaires spécifiques pour stimuler la production de composés intéressants, et également la **co-culture avec d'autres microorganismes puisque** les co-culture peuvent induire l'expression de métabolites secondaires qui ne sont pas produits en culture pure.

Et aussi, **Simulations des conditions environnementales naturelles avec la** recréation des microenvironnements des Actinobactéries dans des conditions de laboratoire pour favoriser leur croissance. L'utilisation d'antagonistes microbiens pour supprimer les bactéries compétitives et favoriser la croissance des Actinobactéries. Les **techniques de bioprospection avancées en** utilisation de drones, de robots sous-marins et de capteurs pour collecter des échantillons de manière ciblée. Et l'utilisation de dispositifs micro fluidique pour isoler des cellules uniques ou des populations microbiennes spécifiques dans des environnements contrôlés à petite échelle.

## Annexes 01

### Composition des milieux de culture :

- **Milieu Czapek amélioré YIM 14**

Saccharose 20 g,

NaNO<sub>3</sub> 2 g,

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g,

KCl 0.5 g

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g

Mélanges de vitamines (Hayakawa et Nonomura, 2016) 3,7 mg

Agar 25 g

pH = 7,2

- **Milieu YIM 17 glycérol asparagine**

L-asparagine 1 g

Glycérol 10 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g

Mélanges de vitamines 3,7 mg

Sel trace\* 1 ml

Agar 20 g

pH= 7.2–7.4

- **Milieu de la farine d'avoine YIM 21**

Fumée d'avoine 20 g

(cuire ou vapeur 20 g de farine d'avoine dans 1000 ml d'eau distillée pendant 20 min, filtrer à travers le tissu de fromage, et ajouter de l'eau distillée pour restaurer le volume du filtrat à

1000 ml)

Mélange de vitamines 3,7 mg

Oligo-sels 1 ml

Agar 20 g

pH= 7,2.

Solution de sels traces :  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{MnCl}_2$  0.1 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, 100 ml d'eau distillée.

- **YIM 6 Milieu amidon-caséine**

Amidon soluble 10 g

Caséine 0,3 g

$\text{KNO}_3$  2 g

$\text{CaCO}_3$  0.02 g

$\text{FeSO}_4$  10 mg

Mélanges de sels\*

Agar 25 g

pH= 7.2–7.4

- **Milieu YIM 47 extraits de sol**

Extraits de sol (sol 400 g, 120°C pendant 1 h, filtrer à travers un tissu de fromage et ajouter de l'eau distillée pour ramener le volume du filtrat à 1000 ml)

Extraits de viande 3 g

Peptone 5 g

Mélanges de sels\*

Agar 25 g

pH= 7,2-7,5

- **Milieu T3 (Jiang *et al.*, 2011)**

Cellulose 10 g

Caséine 0,3 g

KNO<sub>3</sub> 0.2 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g

CaCO<sub>3</sub> 0.02 g

FeSO<sub>4</sub> 10 mg

Mélanges de sels\*

Agar 25 g

pH= 7,5

- **Milieu Horikoshi (Horikoshi *et Grant*, 1989)**

Glucose 10 g

Extraits de levure 5 g

Peptone 5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g

Mélanges de sels\* (pour 1 L) : NaCl 100–150 g, KCl 20 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 30 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g.

Agar 25g

pH= 7,2-7,5

- **Milieu à l'extrait de levure (Crawford *et al.*, 1993)**

Extrait de levure 0,25 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g

Agar 18 g

pH= 7,2

- **Milieu propionate de sodium (Gauze et al., 1983)**

Propionate de sodium 1 g

L-asparagine 0,2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.9 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 g

Agar 15 g,

pH= 7.2.

- **Milieu YIM 7 HV (Hayakawa et Nonomura, 2016)**

Acide humique 1,0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g

KCl 1.7 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g

CaCl<sub>2</sub> 1 g

vitamines B (0.5 mg chacun de thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine, Ca-pantothénate, inositol, acide p-aminobenzoïque, et 0,25 mg de biotine)

Agar 18 g

pH= 7,2

- **Milieu amélioré glycérol-asparagine YIM 171**

Glycérol 10 g

Asparagine 1 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g

CaCO<sub>3</sub> 0.3 g

Mélange de vitamines du milieu HV 3,7 mg

Agar 15 g

pH= 7,2

- **Milieu mycose-proline YIM 212**

Mycose 5 g

Proline 1 g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g

NaCl 1 g

CaCl<sub>2</sub> 2 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1 g

Mélanges de vitamines

Agar 15 g

pH= 7,2

- **Milieu amélioré amidon-caséine YIM 601**

Solution amidon 10 g

Caséine 0,3 g

KNO<sub>3</sub> 2 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05 g

NaCl 2 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g

CaCO<sub>3</sub> 0.02 g

FeSO<sub>4</sub> 10 mg

Mélanges de vitamines

Agar 15 g

pH= 7,2~7,4

- **Milieu aux polysaccharides de champignons YIM 709**

Polysaccharides de chenilles chinoises 1 g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.64 g

NaCl 2 g

KCl 2 g

MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 2 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g

KNO<sub>3</sub> 0.2 g,

CaCO<sub>3</sub> 0.2 g,

FeSO<sub>4</sub> 10 mg

Mélanges de vitamines

Oligo-sels 1 ml

Agar 15 g

pH= 7,5

- **Milieu YIM 711 Caséine peptone de soja**

Caséine 1,5 g

Peptone de soja 0,5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 1 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g

CaCO<sub>3</sub> 0.3 g

NaCl 5 g

Mélanges de vitamines

Agar 15 g

pH =7,5

- **Milieu YIM 212 histidine-raffinose**

Histidine 1 g

Raffinose 5 g

K<sub>2</sub>HPo<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O 1 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g

Agar 20 g

pH= 7,2

- **Milieu oligotrophe**

Peptone 1 g

Extraits de levure 0.5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 1 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g

CaCO<sub>3</sub> 0,3 g

NaCl 5 g

Mélanges de vitamines

Agar 15 g

pH= 7,5

- **Milieu minimal**

Glucose 0,5 g

Extrait de levure 0,5 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g

NaCl 0,5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g

Agar 15 g

pH= 7,5-8

- **Milieu 5006**

Composition (g/l)

Saccharose 3,0

Dextrine 15,0

Extrait de viande 1,0

Extrait de levure 2,0

Bouillon de soja tryptone (Oxoid) 5,0

NaCl 0,5

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5

MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,5

FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,01

Agar 20,0

- **Milieu 5265 (ISP 2 / Géluse à l'extrait de malt )**

Composition (g/l)

Extrait de malt 10,0

Extrait de levure 4,0

Glucose 4,0

Agar 15,0

- **Milieu 5294**

Composition (g/l)

Amidon (soluble) 10,0

Extrait de levure 2,0

Glucose 10,0

Glycérol 10,0

Liqueur de maïs 2,5

Peptone 2,0

NaCl 1,0

CaCO<sub>3</sub> 3,0

- **Milieu 5314 (solution d'oligo-éléments)**

Composition (g/l)

CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O 3,0

Fe-III-citrate 1,0

MnSO<sub>4</sub> 0,2

ZnCl<sub>2</sub> 0,1

CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 0,025

Tétra borate de sodium 0,2

CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,004

Molybdate de sodium 0,01

- **Milieu 5315 (ISP3)**

Composition (g/l)

Flocons d'avoine pour chien 20,0

solution d'oligoéléments (5314) 2,5 ml/l

Agar 18,0

- **Milieu 5322 (ISP 7)**

Composition (g/l)

Glycérol 15,0

L-Tyrosine 0,5

L-Asparagine 1,0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5

NaCl 0,5

FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,01

Solution d'oligo-éléments 5343 1,0 ml/l

Agar 20,0

- **Milieu 5323 (ISP 5)**

Composition (g/l)

L-Asparagine 1,0

Glycérol 10,0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0

Solution saline (voir préparation) 1,0 ml/l

Agar 20,0

- **Milieu 5327**

Composition (g/l)

Glucose 100,0

Extrait de levure 10,0

CaCO<sub>3</sub> 20,0

Agar 18,0

- **Milieu 5333**

Composition (g/l)

Extrait de levure 4,0

Amidon soluble 15,0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0

MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,5

- **Milieu 5337 (Milieu synthétique)**

Composition (g/l)

Glycérol 15,0

Tyrosine 1,0

L-arginine 5,0

Acide L-glutamique 5,0

L-méthionine 0,3

L-isoleucine 0,3

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5

MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,2

Solution d'oligo-éléments (5341) 1,0 ml

Agar 20,0

- **Milieu 5338**

Composition (g/l)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,64

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,38

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,31

MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 1,0

Agar 15,0

solution d'oligoéléments 5342 1.0 ml/l

- **Milieu 5339** (tolérance au Chlorure de sodium)

Composition (g/l)

Pepton de caséine 10,0

Extrait de levure 5,0

Agar 20,0

- **Milieu 5341 (Solution d'oligo-éléments)**

Composition (g/l)

CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 10,0

CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 10,0

FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 10,0

ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 10,0

MnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 40,0

- **Milieu 5342 (Solution d'oligo-éléments)**

Composition (g/l)

CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 0,64

FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,11

ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,15

MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 0,79

- **Milieu 5343 (Solution d'oligo-éléments)**

Composition (g/l)

FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 1,0

ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 1,0

MnCl<sub>2</sub> x 7H<sub>2</sub>O 1,0

- **Milieu 5415 (Milieu Rhodococcus marin)**

Composition (g/l)

Extrait de levure 10,0

Extrait de malt 4,0

Glucose 4,0

Agar 25,0

Eau de mer artificielle 750 ml (voir 5416)

- **Milieu 5416 Eau de mer artificielle**

Composition (g/l)

NaCl 23,477

MgCl<sub>2</sub> 4,981

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,917

CaCl<sub>2</sub> 1,102

KCl 0,664

NaHCO<sub>3</sub> 0,192

KBr 0,096

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,026

SrCl<sub>2</sub> 0,024

NaF 0,003

- **Milieu 5425 (Gélose pour infusion de cerveau et de cœur (BHI))**

Composition (g/l)

Infusion de cervelle de veau 200,0

Infusion de cœur de bœuf 250,0

Caséine (viande) peptone 10,0

Glucose 2,0

NaCl 5,0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5

Agar 15,0

- **Milieu 5426 (Trypticase Soy Agar)**

Composition (g/l)

Peptone de caséine 15,0

Pepton de soja 5,0

NaCl 5,0

Agar 15,

- **Milieu 5429 (Milieu Streptomycètes)**

Composition (g/l)

Glucose 4,0

Extrait de levure 4,0

Extrait de malt 10,0

CaCO<sub>3</sub> 2,0

Agar 12,0

- **Milieu 5436 (Milieu Trypticase Soja Extrait de Levure)**

Composition (g/l)

Bouillon trypticase soja 30,0

Extrait de levure 3,0

Agar 15,0

- **Milieu 5630** (Middlebrook 7H9)

Composition (g/l)

Bouillon de base Middelbrook 7H9 4,7

Glycérol 2,0

Acides casaminés 11,0

Extrait de levure 5,5

Tween80 (20%) 2,5

Enrichissement OADC 100 ml/l

Agar 15,0

- **Milieu 5631 (Middlebrook 7H10)**

Composition (g/l)

Agar Middelbrook 7H10 19,0

Glycérol 5,0

Enrichissement OADC 100 ml

- **Milieu 5632 (Middlebrook 7H11)**

Composition (g/l)

Agar Middelbrook 7H10 20,0

Glycérol 5,0

Enrichissement OADC 100 ml

- **Milieu 5633 (OADC-Stock)**

Composition (g/l)

Albumine de sérum bovin fraction V 50,0

1% acide leique dans 0,2N Na OH 50,0

Glucose 20,0

Na Cl 8,5

## Références Bibliographiques

AALLAM Y. (2021). Application biotechnologiques des Actinobactéries pour l'amélioration de l'efficacité agronomique du phosphate et du potassium naturels en vue d'une meilleure productivité de la betterave à sucre. Thèse de Doctorats : Microbiologie et Biotechnologie végétale. Université Sultan Moulay Slimane., 177 p.

Abbas I. H. (2006). Biological and biochemical studies of actinomycètes isolated from Kuwait saline soil-kuwait. *Journal of applied science research*, 2(10), p : 809-815.

Anandan R., Dhanasekaran D. and Manogaran G. P. (2016). An introduction to actinobacteria. In : Dhanasekaran Dh. and Jiang Y. Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. India : IntechOpen. p : 3-36.

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

Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H. P. and van Wezel G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), p : 1-43.

Becking J. (1974). Family III. Frankiaceae Becking 1970 dans : Buchanan RE. and Gibbon NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. p : 701-706.

Boudemagh A. (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de doctorat : microbiologie appliquée. Université Mentouri, Constantine. 144p.

Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrilti A. and Sabaou N. (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of Streptosporangium Sg 10 isolated from a Saharian soil. *Microbiol Res*, 161, p : 288-298.

Bozal N., Montes M. J., Miiiana-Galbis D., Manresa A. and Mercade E. (2009). *Shewanellavesiculosa* sp. Nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 59, p : 336-340.

Colombié V. (2005). Description de la production de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de doctorat : Microbiologie et Biocatalyse industrielles. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse., 174p.

Cross T. (1974). Actinobacteria in soil and freshwater ecosystems. *Journal of Applied Bacteriology*, 37(2), p : 173-187.

Daquioag J. E. L. and Penuliar G. M. (2021). Isolation of actinomycetes with cellulolytic and antimicrobial activities from soils collected from an Urban Green Space in the Philippines. *International journal of microbiology*, (4), p : 1-4.

Demain A. L. ( 2000 ) . Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 52, p : 455-463.

Dietz A. and Mathews J. (1970). Selective isolation of Actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 19(4), p : 568-570.

Dietz A. and Mathews J. (1970). Selective isolation of Actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 19(4), p : 568-570.

Divya P., Neelu N., Mansi P., Manish B., Abul M., Madhukar K. and Balasaheb K. (2013). Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential revenue resource. *Journal of BioMed Research International*, 2013, p : 8.

Djibaoui R. and Bensoltane A. (2005). Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol*, 4 (7), p : 697-702.

Djinni, I. (2009). Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées production de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Bejaia. Thèse de Magister : Microbiologie Appliquée. Bejaia : Université. A. Mira de Bejaia. 50-60 p.

Edition Médecine-Science. Flammarion. France. pp 935-949. Cité dans : mémoire de Master, Recherche des souches d'actinomycètes productrices des enzymes pectinolytiques à partir des sols aride de la wilaya d'Al Bayadh, (2015).

Flardh K. et Buttner JM. (2009). Morphogénétique de Streptomyces : dissection de la différenciation chez une bacteria filamenteuse. *Nat Rev Microbiol*, 7(1), p : 36-49.

Gebreselema G., Samuel S. and Nagappan R. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, p: 426-435.

Gebreyohannes G., Moges F., Sahile S. and Raja N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), p : 426–435.

Ghanem NB., Sabry SA., El-Sherif ZM. and Abu El-Elal GA. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J Gen Appl Microbiol*, 46, p: 105– 111.

Goodfellow M. and Fiedler H. P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(2), p : 119-142.

Goodfellow M. and Williams S. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*, 37(1), p : 189–216.

Hakvag S., Fjaervik E., Josefsen K. D., Ian E., Ellingsen T. E. and Zotchev S. B. (2008). Characterization of Streptomyces spp. isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim fjord, Norway. *Mar Drugs*, 6(4), p : 20-635.

Hayakawa M. and Nonomura H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 65(5), p : 501-509.

Hazarika S. N. and Thakur D. (2020). Actinobacteria. Beneficial Microbes in Agro- ecology, Elsevier. P : 443-476.

Hirsch M. and Valdés M. ( 2009 ). Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry*,7, p : 1-7.

Hsu SC. and Lockwood JL. (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied microbiology*, 29 (3), p : 422-426.

Hugenholtz P., Goebel B. M. and Pace N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180(18), p : 4765-4774.

Ibrahimi M. (2020). Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine. Thèse de Doctorat : Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Poitiers., 263 p.

Javad H. and Naghmeh P. (2017). The Cellular Structure of Actinobacteria. In : Joachim W., Fatemeh M. and Javad H. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Suisse : Springer. P : 5-28.

Javad H., Naghmeh P. and Joachim W. (2017). The Role of Actinobacteria in Biotechnology. In : Joachim W., Fatemeh M. and Javad H. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Suisse : Springer. P : 269-328.

Jiang Y., Li Q., Chen X. and Jiang C. (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria. In : Dhanasekaran Dh.et Jiang Y. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. India : IntechOpen. P : 39-57.

Jiang Y., Li W.J., Xu P., Tang S.K. and Xu L.H. (2006). Study on diversity of Actinomycetes under salt and alkaline environments. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 46(2), p:191-5.

Khanna M., Solanki R. and Lal R. (2011). Selective isolation of rare actinomycetes producing novel

antimicrobial compounds. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research ISSN 0976-2612*, 2

(3), p : 357-375.

Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystème extrême. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'état : Microbiologie appliquée. Université des frères Mentouri Constantine. 170p.

Kurtböke D.İ. (2017). Ecology and Habitat Distribution of Actinobacteria. In : Joachim W., Fatemeh M. and Javad H. Biology and Biotechnology of Actinobacteria. Suisse : Springer. P : 123-149.

Lacey J. (1997). Actinomycetes in compost. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 4(1), p : 113-121.

Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie., 186 p.

Lechevalier M.P. P. (1981).ecological association involving actinomycètes .In : Actinomycètes Shaal and Pulverer (Eds).Zbl Bakt Suppl 11 :159-166. Cité dans : mémoire de Master, Actinobactéries des sols arides : Agent promoteurs en agriculture et dans la production d'antibiotiques. (2021).

Lechevalier H. A. and Lechevalier M. P. (1967). Biology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 21(1), p : 71-100.

Lechevalier H. A., and Lechevalier M. P. (1967). Biology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 21(1), p : 71-100.

Leveau J .Y and Bouix M. (1993). Microbiologie Industrielle. Paris : Lavoisier Tec & Doc. 424-439 p. Sciences et techniques agroalimentaires.

Lewin G. R., Carlos C., Chevrette M. G., Horn H. A., McDonald B. R., Stankey R. J. and Currie C. R. (2016). Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual review of microbiology*, 70, p : 235 -254.

Lewin G.R. Carlos C. Chevrette M. G. Horn H.A. McDonald B. R. Stankey R. J. Fox B. G. and Currie C.R. ( 2016). Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their BioenergyApplications. *The Annual Review of Microbiology*, (70), p: 235-254.

Li Q., Chen X., Jiang Y and Jiang C. (2016). Morphological Identification of Actinobacteria. In : Dhanasekaran Dh. and Jiang Y. Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. India : IntechOpen. p : 59-86.

Li S., Chena C., Zhang H., Guo H., Wang H., Wang L., Zhang X., Huac S., Yu J., Xiao, P., Li R. and Tan X. (2005). Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiv. Res*, 67, p :18–23.

Liu Q., Tian J. H., Liu H. C., Zhou Y. G. and Xin Y. H. (2019). *Cryobacterium melibiosiphilum* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacier ice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(10), p : 3276-3280.

Mariat F. and Sebald M. (1990). Actinomycètes In: Le Minor L. and Véron M. Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion. p : 935-949.

Mariat F. et Sebald M. (1990). Les actinomycètes. In: Bactériologie médicale. Le Minor.

Medjemadj M. (2021). Etude de la biodiversité des actinobactéries dans quelques eaux thermales de la région Est de l'Algérie. Thèse de Doctorats : Ecologie microbienne. Université des frères Mentouri Constantine., 110 p.

Mellouli L., Mehdi RB., Sioud S., Salem M. and Bejar S. (2003). Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res Microbiol*, 154(5), p : 345-352.

Mohammadipanah F. and Dehghani M. (2017). Classification and Taxonomy of Actinobacteria. In : Joachim W., Fatemeh M. and Javad H. Biology and Biotechnology of Actinobacteria. Suisse : Springer. P : 51-77 p.

Nafis A., Raklami A., Bechtaoui N., El Khalloufi F., El Alaoui A., Glick B R., Hafidi M., Kouisni L., Ouhdouch Y. and Hassani L. (2019). Actinobacteria from Extreme Niches in Morocco and Their Plant Growth-Promoting Potentials. *Diversity*, 11(8), p: 139.

Oskay M., Tamer A. and Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol*, 3(9), p : 441–446.

Oskay M ; Tamer AU. and Azeri C. (2004). antibacterial activity of some actinomycètes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3(9), p : 441-446.

Prescott L. M., Harley J. P. et Klein D. A. (2003). *Microbiologie*. Bruxelles : De Boeck. 1164 p.

Prescott L. M., Harley J. P. et Klein D. A. (2010). *Microbiologie*. Bruxelles : De Boeck. 1120 p.

Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A., (2010). *Microbiologie*. Bruxelles : De Boeck. 1133 p.

Procópioa R. E. d. L., Da Silvaa I. R., Martinsa M. K., de Azevedoa J. L. and de Araújo J. M. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *Brazilian J. Infect. Dis*, 16, p : 466–471.

Seipke R. F., Kaltenpoth M. and Hutchings M. I. (2012). Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS microbiology reviews*, 36(4), p : 862-876.

Sengupta S., Pramanik A., Ghosh A. and Bhattacharyya M. (2015). Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiol*, 15, p: 170.

Stackebrandt E. and Goebel B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), p : 846-849.

Sutthinan K., Akira Y. and Aaisamorn L. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils : Diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal Microbiol Biotechnol* ,25, p: 649–655.

Tang S. K., Wang Y., Wu J. Y., Cao L. L., Lou., Xu L.H., Jiang C. L. and Li W. J. (2009). *Saccharopolyspora qijiaojingensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 59(9), p : 2166-2170.

Thumar J. T. and Singh S. P. (2007). Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. *Brazilian journal of Microbiology*, 38, p : 766-772.

Thumar J., and Singh S. P. (2007). Two-step purification of a highly thermostable alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *Journal of Chromatography B*, 854(1-2), p : 198-203.

Tokala R. K., Strap J. I., Jung C. M., Crawford D. L., Salove M. H., Deoblad L. A., Bailey J. F. and Morra. M. J. (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, p : 2161-2171.

Valan Arasu M., Duraipandiyan V., Agastian P. and Ignacimuthu S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale*, 19 (1), p : 22 – 28.

Valois D., Fayad K., Barasubiye T., Garon M., Dery C., Brzezinski R., and Beaulieu C. (1996). Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), p : 1630-1635.

Van der Meij A., Worsley S. F., Hutchings M. I. and van Wezel G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), p : 392–416.

Waksman S. A., Reilly H. C. and Harris D. A. (1948). *Streptomyces griseus* (Krausky) Waksman and Henrici. *Journal of Bacteriology*, 56(3), p : 259.

Wang L., Peng C., Gong B., Yang Z., Song J., Li L., Xu L., Yue T., Wang X., Yang M., Xu H. and Liu X (2022). Actinobacteria Community and Their Antibacterial and Cytotoxic Activity on the Weizhou and Xieyang Volcanic Islands in the Beibu Gulf of China. *Front. Microbiol.*, 13, p : 1-2.

Williams S. T. and Wellington E. M. H. (1982). Methods for the isolation and estimation of actinomycetes in soil. In: *Biology of Actinomycetes*. Academic Press, p : 141-147.

Wink J., Mohammadipanah F. and Panahi H. K. S. (2017). Practical aspects of working with actinobacteria. In : Joachim W., Fatemeh M. et Javad H. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Suisse : Springer. P : 329-376.

Wink, J. (2015). Methods for the taxonomic description of the Actinobacteria. *Compendium of Actinobacteria*. P : 1-37.



Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : ALLEG Malek  
ADES Ahlem

## **Données théoriques sur les méthodes conventionnelles d'isolements et d'identifications des actinobactéries originaires de certains écosystèmes.**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Appliquée**

### **Résumé**

Les Actinobactéries sont un groupe de bactéries à Gram positif, possédant un pourcentage GC élevé, caractérisées par leur morphologie filamenteuse et leur capacité à produire une variété de métabolites bioactifs. Les Actinobactéries, découvertes au 19e siècle, ont évolué à travers différentes périodes, depuis une concentration sur les organismes pathogènes jusqu'à l'introduction de méthodes génétiques dans les années 1960, bouleversant ainsi leur classification et leur utilisation biotechnologique. Dans notre travail, nous avons abordé plusieurs points notamment : caractéristique et diversité des Actinobactéries. Les Actinobactéries se retrouvent dans une grande diversité d'habitats, incluant les sols, les eaux douces et marines, ainsi que les environnements extrêmes tels que les sols arides, les sources chaudes, et même les organismes symbiotiques. Ces dernières sont utilisées dans une multitude d'applications biotechnologiques, notamment dans la production d'antibiotiques, d'enzymes industrielles, de médicaments, ainsi que dans la dégradation de composés organiques et la bioconversion de substrats. Dans ce travail, les méthodes classiques d'isolement ont été abordées ainsi que les étapes d'identification des Actinobactéries, ces méthodes offrent une approche simple et économique, mais peuvent présenter des limitations en termes de sélectivité et de récupération des espèces moins abondantes ou difficiles à cultiver. En conclusion, bien que les méthodes d'isolement classiques des Actinobactéries soient largement utilisées, leur efficacité peut être améliorée par l'intégration de techniques modernes de culture et de caractérisation pour une meilleure représentation et exploitation de la diversité de ces microorganismes.

**Mots-clefs :** *Actinobacteria*, approches conventionnelles, milieux sélectifs, méthodes d'identification.

**Laboratoires de recherche :** laboratoire de .....(U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Président du jury :** BOUDEMAGH Allaouddine (Pr - U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Encadrant :** MEDJEMADJ Meissa (MAB- U Constantine 1 Frères Mentouri)

**Examineur(s) :** BOUFERCHA Oumeima (MAB- U Constantine 1 Frères Mentouri)