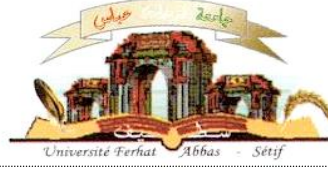


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2015

THÈSE

Présentée par

**SAKER Rafika**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT 3<sup>ÈME</sup> CYCLE**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE**

THÈME

Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles  
des sols sahariens et potentialités antagonistes

Soutenue publiquement le ...../...../2015

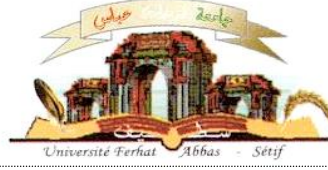
DEVANT LE JURY

Président	<b>ZERROUG Mohamed Mihoub</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>SABAOU Nasserline</b>	<b>Pr. ENS Kouba. Alger</b>
Co-directeur	<b>BOURAS Noureddine</b>	<b>MCA. Univ. Ghardaïa</b>
Examineurs	<b>BOUDEMAGH Allaoueddine</b>	<b>Pr. Univ. Mentouri. Constantine</b>
	<b>MEZAACHE Samia</b>	<b>MCA. UFA Sétif 1</b>
	<b>HABI Salah</b>	<b>MCA. UFA Sétif 1</b>

*Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens*

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2015

**THÈSE**

Présentée par

**SAKER Rafika**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT 3<sup>ÈME</sup> CYCLE**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE**

**THÈME**

Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles  
des sols sahariens et potentialités antagonistes

Soutenue publiquement le ...../...../2015

DEVANT LE JURY

Président	<b>ZERROUG Mohamed Mihoub</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>SABAOU Nasserline</b>	<b>Pr. ENS Kouba. Alger</b>
Co-directeur	<b>BOURAS Noureddine</b>	<b>MCA. Univ. Ghardaïa</b>
Examineurs	<b>BOUDEMAGH Allaoueddine</b>	<b>Pr. Univ. Mentouri. Constantine</b>
	<b>MEZAACHE Samia</b>	<b>MCA. UFA Sétif 1</b>
	<b>HABI Salah</b>	<b>MCA. UFA Sétif 1</b>

*Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens*

## TABLE DES MATIERES

**Avant-propos**

**Liste des abréviations**

**Index des tableaux**

**Index des figures**

**Résumé**

**ملخص**

**INTRODUCTION GENERALE** 1

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

**I. TAXONOMIE DES ACTINOBACTERIES** 5

**1. Critères d'identification des actinobactéries et taxonomie générale** 5

1.1. Définition des actinobactéries et classification supragénérique 5

1.1.1. Définition 5

1.1.2. Classification supragénérique 5

1.2. Critères morphologiques 7

1.2.1. Caractères macromorphologiques 7

1.2.2. Caractères micromorphologiques 9

1.3. Critères physiologiques 10

1.3.1. Caractères physiologiques utilisés 10

1.3.2. Taxonomie numérique 10

1.4. Critères chimiques 11

1.4.1. Composition pariétale en acides aminés 11

1.4.2. Composition cellulaire en sucres 11

1.4.3. Compositions membranaire et pariétale en lipides 13

1.4.3.1. Les phospholipides 13

1.4.3.2. Les acides gras 13

1.4.3.3. Les ménaquinones 14

1.4.3.4. Les acides mycoliques 16

1.5. Critères moléculaires 16

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

1.5.2. Hybridation ADN-ADN 20

1.5.3. Pourcentage en guanine-cytosine 20

<b>2. Taxonomie des actinobactéries halophiles</b>	21
2.1. Définition de l'halophilie et l'halotolérance	21
2.2. Actinobactéries halophiles	22
2.2.1. Famille des <i>Actinopolysporaceae</i>	22
2.2.2. Famille des <i>Nocardiopsaceae</i>	23
2.2.2.1. <i>Nocardiopsis</i>	23
2.2.2.2. <i>Streptomonospora</i>	23
2.2.2.3. <i>Haloactinospora</i>	24
2.2.2.4. <i>Thermobifida</i>	24
2.2.2.5. <i>Salinactinospora</i>	24
2.2.3. Famille des <i>Pseudonocardiaceae</i>	24
2.2.3.1. <i>Saccharopolyspora</i>	24
2.2.3.2. <i>Saccharomonospora</i>	25
2.2.3.3. <i>Prauserella</i>	25
2.2.3.4. <i>Haloechothrix</i> et <i>Yuhushiella</i>	25
2.2.4. Espèces appartenant à d'autres genres	26
<b>II. DISTRIBUTION DES ACTINOBACTERIES DANS L'ENVIRONNEMENT</b>	26
<b>1. Les actinobactéries en général</b>	26
<b>2. Les actinobactéries halophiles et halotolérantes</b>	28
2.1. Distribution	28
2.2. Mécanisme d'adaptation aux conditions salines	28
2.2.1. Adaptation à la salinité par production d'osmoprotecteurs	29
2.2.2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl	29
<b>III. IMPORTANCE DES ACTINOBACTERIES HALOPHILES</b>	29
<b>1. Production de composés antimicrobiens, antiviraux et anticancéreux</b>	30
<b>2. Production d'enzymes</b>	31
<b>3. Synthèse des solutés compatibles</b>	32
<b>4. Production de composés détoxifiants</b>	32
<b>5. Autres applications potentielles</b>	33
<b>IV. PROPRIETES ANTAGONISTES ET ANTIBIOTIQUES DES ACTINOBACTERIES</b>	33
<b>1. Recherche de nouvelles molécules bioactives</b>	33

1.1. Méthodes classiques	34
1.1.1. Isolement des actinobactéries et conditions de culture	34
1.1.2. Choix des microorganismes-cibles	35
1.1.3. Production et caractérisation des antibiotiques	35
1.2. Méthodes actuelles	35
<b>2. Les antibiotiques produits par les actinobactéries</b>	<b>36</b>
<b>3. Les polycétones (polykétides) et les “ Non-Ribosomal Peptide Synthetases ”</b>	<b>37</b>
3.1. Les polycétones (polykétides)	37
3.1.1. Différents types de PKS	38
3.2. Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS)	41
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>I. SITES D’ETUDES ET ECHANTILLONS DE SOLS</b>	<b>44</b>
1. Site d’étude	44
2. Echantillons de sols	45
2.1. Prélèvements	45
2.2. Caractéristiques pédologiques	45
<b>II. ISOLEMENT, DENOMBREMENT, PURIFICATION ET CONSERVATION DES SOUCHES</b>	<b>45</b>
1. Milieux d’isolement	45
2. Technique d’ensemencement et conditions d’incubation	46
3. Dénombrement et sélection des actinobactéries	46
4. Purification et conservation	46
<b>III. ETUDE TAXONOMIQUE DES ACTINOBACTERIES HALOPHILES</b>	<b>47</b>
1. Etude morphologique	47
1.1. Étude macromorphologique	47
1.2. Etude micromorphologique	47
2. Etude chimique des constituants cellulaires	48
2.1. Obtention de la biomasse	48
2.2. Détermination de l’isomère de l’acide diaminopimélique et mise en évidence de la glycine	48

2.3. Analyse des sucres	49
2.4. Identification des phospholipides membranaires	50
2.5. Identification des acides gras membranaires	51
2.5.1. Saponification	51
2.5.2. Méthylation	51
2.5.3. Extraction	52
2.5.4. Lavage	52
2.5.5. Détection des acides gras	52
2.6. Identification des ménaquinones membranaires	52
<b>3. Etude physiologique et taxonomie numérique</b>	<b>53</b>
3.1. Etude physiologique	53
3.1.1. Utilisation des glucides et dérivés	53
3.1.2. Utilisation de différentes sources d'azote	54
3.1.3. Décarboxylation des acides organiques	54
3.1.4. Dégradation de la xanthine, de l'hypoxanthine, de l'adénine, de la tyrosine et de la guanine	54
3.1.5. Dégradation de la caséine du lait	55
3.1.6. Dégradation de l'amidon	55
3.1.7. Dégradation de la gélatine	55
3.1.8. Dégradation de l'esculine et de l'arbutine	55
3.1.9. Dégradation du Tween 80	55
3.1.10. Production de nitrate réductase	55
3.1.11. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques	56
3.2. Taxonomie numérique	56
<b>4. Etude moléculaire des actinobactéries halophiles</b>	<b>57</b>
4.1. Extraction de l'ADN total	57
4.2. Amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S par PCR	57
4.3. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et analyses phylogénétiques	58
4.4. Hybridation ADN-ADN	59
4.4.1. Extraction de l'ADN	59
4.4.2. Dénaturation et hybridation	59
4.4.3. Lecture des résultats	60
<b>IV. ETUDES DES PROPRIETES ANTAGONISTES</b>	<b>60</b>
<b>1. Criblage classique</b>	<b>60</b>
<b>2. Criblage moléculaire</b>	<b>61</b>

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

<b>I. ISOLEMENT ET DISTRIBUTION DES ACTINOBATERIES MYCELIENNES DANS LES SOLS</b>	<b>63</b>
<b>1. Isolement et distribution</b>	<b>63</b>
<b>2. Choix des souches et purification</b>	<b>65</b>
<b>3. Discussion</b>	<b>66</b>
<b>II. ETUDES PHENOTYPIQUE ET CHIMIOTAXONOMIQUE DES ACTINOBATERIES MYCELIENNES HALOPHILES</b>	<b>67</b>
<b>1. Etude morphologique</b>	<b>67</b>
1.1. Groupe 1 (G1)	68
1.2. Groupe 2 (G2)	69
1.3. Groupe 3 (G3)	70
1.4. Groupe 4 (G4)	72
1.5. Groupe 5 (G5)	73
<b>2. Etude chimiotaxonomique</b>	<b>74</b>
2.1. Détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et des sucres	74
2.1.1. Groupes G1 et G2	74
2.1.2. Groupes G3, G4 et G5	75
2.2. Détermination des acides gras, des ménaquinones et des phospholipides	77
<b>3. Etude physiologique et taxonomie numérique</b>	<b>79</b>
3.1. Caractéristiques physiologiques	79
3.1.1. Isolats du groupe G1	79
3.1.2. Isolats du groupe G2	79
3.1.3. Isolats du groupe G3	80
3.1.4. Isolats du groupe G4	80
3.1.5. Isolats du groupe G5	80
3.2. Taxonomie numérique	97
3.2.1. Isolats du cluster I	97
3.2.2. Isolats du cluster II	97
3.2.3. Isolats du cluster III	97
3.2.4. Isolats du cluster IV	97
3.2.5. Isolats du cluster V	98
3.2.6. Isolats du cluster VI	98
3.2.7. Isolats du cluster VII	98

<b>4. Discussion</b>	99
<b>5. Conclusion</b>	101
<b>III. ETUDES PHYLOGENETIQUES ET IDENTIFICATION DES GENRES ET DES ESPECES</b>	102
<b>1. Etudes phylogénétiques</b>	102
1.1. Clusters III et IV	103
1.2. Clusters II et VI	105
1.3. Clusters I, V et VII	109
1.3.1. Souches du cluster I	109
1.3.2. Souches du cluster V	109
1.3.3. Souches du cluster VII : phylogénie, signatures des nucléotides et pourcentage de GC	109
<b>2. Hybridation ADN-ADN</b>	115
2.1. Souches H195, H150 et H151 de <i>Mzabimyces</i>	116
2.2. Souches H225 et H137 de <i>Prauserella</i>	116
2.3. Souche H254 d' <i>Actinopolysora</i>	117
2.4. Souche H255 d' <i>Actinopolysora</i>	117
<b>3. Description de nouveaux taxons</b>	118
3.1. Description de <i>Mzabimyces algeriensis</i> sp. nov. appartenant à un nouveau genre et une nouvelle famille	118
3.1.1. Description de la famille des <i>Mzabimycetaceae</i> fam. nov.	118
3.1.2. Description du genre <i>Mzabimyces</i> gen. nov.	118
3.1.3. Description de <i>Mzabimyces algeriensis</i> sp. nov.	119
3.2. Description de <i>Prauserella isguenensis</i> sp. nov.	120
3.3. Description d' <i>Actinopolysora biskrensis</i> sp. nov.	121
<b>4. Discussion</b>	122
4.1. Souches du genre <i>Actinopolysora</i> (cluster I)	122
4.2. Souches du genre <i>Prauserella</i> (cluster II)	123
4.3. Souches du genre <i>Streptomonospora</i> (cluster III)	124
4.4. Souches du genre <i>Nocardiopsis</i> (cluster IV)	125
4.5. Souches du genre <i>Saccharopolyspora</i> (cluster V)	126
4.6. Souches du genre <i>Saccharomonospora</i> (cluster VI)	126
4.7. Souches du genre <i>Mzabimyces</i> (cluster VII)	127
<b>5. Conclusion</b>	127



<b>V. PROPRIETES ANTAGONISTES DES ACTINOBACTERIES HALOPHILES</b>	128
<b>1. Mise en évidence sur milieu gélosé</b>	128
<b>2. Recherche de potentialités antagonistes des actinobactéries non actives par le screening moléculaire</b>	129
<b>3. Discussion</b>	135
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	139
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	143
<b>ANNEXES</b>	174

## Avant-Propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur SABAOU Nasserline et la codirection de Monsieur BOURAS Nouredine, Maître de Conférences (A) à l'Université de Ghardaïa. Une partie des travaux a également été réalisée au Laboratoire de Microbiologie de DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) en Allemagne et au Laboratoire de Génie Chimique (LGC, ENSAT, Toulouse).

Je remercie en premier lieu le Professeur SABAOU Nasserline, pour m'avoir prodigué, avec des qualités humaines et scientifiques exceptionnelles, des encouragements, des critiques constructives et surtout des conseils avisés. J'ai tout particulièrement apprécié son entière disponibilité tout au long de ma partie expérimentale et de la rédaction des articles et de la thèse. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements et ma totale reconnaissance pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire de recherche. Qu'il trouve ici toute ma gratitude.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-directeur de thèse, Monsieur BOURAS Nouredine, Maître de Conférences A à l'Université de Ghardaïa, pour sa grande contribution à mes travaux de recherche, pour son aide précieuse, pour ses compétences scientifiques, pour ses conseils scientifiques précieux, pour ses encouragements et sa bonne humeur.

Je remercie vivement le Professeur Hans-Peter KLENK, Directeur du Laboratoire de Microbiologie de DSMZ (Allemagne) pour sa collaboration très fructueuse, ses compétences scientifiques très élevées et ses qualités humaines et pour toutes les facilités accordées pour permettre la réalisation d'une partie des travaux, ainsi que le Pr. Florence MATHIEU (LGC, Toulouse) d'avoir eu la gentillesse pour m'accueillir dans son laboratoire pour un complément de travaux.

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

- M. ZERROUG Mohamed Mihoub, Professeur à l'Université Ferhat Abbas de Sétif 1, pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de présider le Jury,
- M. BOUDEMAGH Allaoueddine, Professeur à l'Université Mentouri de Constantine,

- Madame MEZAACHE Samia et Monsieur HABI Salah, Maîtres de Conférences A à l'Université Ferhat Abbas, Sétif 1.

Que tous les membres trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir bien voulu être les évaluateurs de mes travaux malgré leurs nombreuses occupations et pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de participer au jury de cette thèse.

Une pensée pour le Professeur Mostefa GHOUL, pour ses conseils et pour m'avoir orienté en début de thèse. Je le remercie vivement.

Parfois dire merci n'est pas suffisant pour exprimer ce que l'on peut ressentir; un grand merci à Madame MEKLAT Atika, Maîtres de Conférences A à l'Université de Blida 1, pour sa présence, son aide si précieuse, ses sacrifices et ses encouragements sans limite.

J'aimerais également exprimer mes vifs remerciements et amitiés à tous les membres du laboratoire LBSM de l'ENS de Kouba: Zitouni A., Boubetra D., Lamari L., Toumatia O., Yekkour A., Boudjella H., Mokrane S., Badji B., Belghit S., Merrouche R., Boudjelal F., Bakour L., Riba A., Driche E., Aouiche A., Belaouni HA., Zebiri S., Bouti K., Azzoune N., Khebizi N., Bouznada K., Chaabane Chaouch F., Reghioui H., Dif G., Tata S., Laassami A. et Kaci S. J'adresse mes remerciements également à toute l'équipe du Laboratoire de Génie Chimique de l'ENSAT de Toulouse.

Une pensée profonde comblée d'amour et d'affection à ma défunte mère, à mon père, mes sœurs et mon frère, mon fiancé et mes beaux parents.

## Liste des abréviations

<b>ACP:</b> Acyle carrier protein	<b>KS:</b> Ketosynthase
<b>ARA:</b> Arabinose	<b>L:</b> Lipide non déterminé
<b>AT:</b> Acyl transférase	<b>MA:</b> Mycélium aérien
<b>ATTC:</b> American Type Culture Collection	<b>MEGA:</b> Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<b>BET:</b> Bromure d'éthyldium	<b>MRSA:</b> Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>BLAST:</b> Basic Local Alignment Search Tool	<b>MS:</b> Mycélium du substrat
<b>BSA:</b> Bovine serum albumin	<b>MT:</b> Méthyltransférase
<b>CCM:</b> Chromatographie sur couche mince	<b>MTCC:</b> Microbial Type Culture Collection
<b>CE:</b> Conductivité électrique	<b>NCBI:</b> National Center for Biotechnology Information
<b>CECT:</b> Spanish Type Culture Collection	<b>NRPS:</b> Non-Ribosomal Peptide Synthetase
<b>CHV:</b> Chitine-vitamines B agar	<b>NRRL:</b> Northern Regional Research Center
<b>CMA:</b> Complex medium agar	<b>OH-PE:</b> Hydroxyphosphatidyléthanolamine
<b>CoA:</b> Coenzyme-A	<b>OH-PME:</b> Hydroxyphosphatidylméthyléthanolamine
<b>CPG:</b> Chromatographie en phase gazeuse	<b>PC:</b> Phosphatidylcholine
<b>DAP:</b> Acide diaminopimélique	<b>PCR:</b> Polymerase Chain Reaction
<b>DH:</b> Déhydratase	<b>PE :</b> Phosphatidyléthanolamine
<b>DMSO:</b> Diméthylsulfoxyde	<b>PG:</b> Phosphatidylglycérol
<b>dNTP:</b> Désoxyribonucléotide triphosphate	<b>PHB:</b> Polyhydroxybutyrate
<b>DPG:</b> Diphosphatidylglycérol	<b>PI:</b> Phosphatidylinositol
<b>DSMZ:</b> German Collection of Microorganisms and Cell Cultures	<b>PKS:</b> Polyketides synthases
<b>EDTA:</b> Ethylenediaminetetra acetic acid	<b>PKSE:</b> Enediène polyketide synthase
<b>ER:</b> Enoyl reductase	<b>PME:</b> Phosphatidylméthyléthanolamine
<b>GAL:</b> Galactose	<b>POU:</b> Protéines d'Origine Unicellulaire
<b>GL:</b> Glycolipide non déterminé	<b>PS:</b> Pigment soluble
<b>GLU:</b> Glucose	<b>Rf:</b> Rapport frontal
<b>GN:</b> Gélose nutritive	<b>RHA:</b> Rhamnose
<b>GPL:</b> Glycophospholipide (= PIM = phosphoinositol mannoside).	<b>RIB:</b> Ribose
	<b>RMN:</b> Résonance Magnétique Nucléaire
	<b>rpm:</b> rotation par minute
	<b>T:</b> Thioestérase

**HPLC:** High Performance Liquid  
Chromatography  
**INRA:** Institut National de Recherche  
Agronomique  
**ISM:** Indice de Sokal et Michener  
**ISP:** International *Streptomyces* Project  
**KR:** Ketoreductase

**TAE:** Tris acétate-EDTA  
**TE:** Thioesterase  
**UMA:** Unité de Masse Atomique  
**UPGMA:** Unweighted Pair-Group Method using the  
Arithmetic Average  
**XYL:** Xylose

## Index des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries (Goodfellow <i>et al.</i> , 2012).	8
<b>Tableau 2.</b> Chimiotypes rencontrés chez les actinobactéries.	12
<b>Tableau 3.</b> Types de phospholipides caractéristiques présents chez les actinobactéries (Lechevalier <i>et al.</i> , 1977).	13
<b>Tableau 4.</b> Profils des acides gras chez les actinobactéries (Kroppenstedt, 1985).	14
<b>Tableau 5.</b> Principaux types de ménaquinones retrouvées chez les actinobactéries (Kroppenstedt (1985).	15
<b>Tableau 6.</b> Signatures basées sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de certaines familles des actinobactéries (Goodfellow <i>et al.</i> , 2012).	19
<b>Tableau 7.</b> Classification des microorganismes en fonction de leur tolérance au NaCl (Kushner, 1978).	22
<b>Tableau 8.</b> Habitats de certaines actinobactéries (Williams <i>et al.</i> , 1984).	27
<b>Tableau 9.</b> Quelques métabolites bioactifs décrits chez les actinobactéries halophiles ou halotolérantes.	31
<b>Tableau 10.</b> Liste des amorces utilisées pour l'amplification des PKSs et NRPS.	61
<b>Tableau 11.</b> Dénombrement des actinobactéries halophiles dans les échantillons de sols et codification des souches sélectionnées.	64
<b>Tableau 12.</b> Caractéristiques culturelles des 16 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G1.	68
<b>Tableau 13.</b> Caractéristiques culturelles des 7 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G2.	69
<b>Tableau 14.</b> Caractéristiques culturelles des 19 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G3.	71
<b>Tableau 15.</b> Caractéristiques culturelles des 4 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G4.	72
<b>Tableau 16.</b> Caractéristiques culturelles des 45 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G5.	73
<b>Tableau 17.</b> Détermination de l'isomère de DAP et des sucres chez les isolats représentant les groupes 1 et 2.	75
<b>Tableau 18.</b> Détermination de l'isomère de DAP et des sucres chez les isolats représentant les groupes 3, 4 et 5.	75
<b>Tableau 19.</b> Composition des quatre isolats d'actinobactéries mycéliennes halophiles en acides gras, en ménaquinones et en phospholipides.	77
<b>Tableau 20.</b> Caractéristiques physiologiques des isolats du groupe G1.	82

<b>Tableau 21.</b> Caractéristiques physiologiques des isolats du groupe G2.	84
<b>Tableau 22.</b> Caractéristiques physiologiques des isolats du groupe G3.	86
<b>Tableau 23.</b> Caractéristiques physiologiques des isolats du groupe G4.	88
<b>Tableau 24.</b> Caractéristiques physiologiques des isolats H100 à H166 appartenant au groupe G5.	89
<b>Tableau 25.</b> Caractéristiques physiologiques des isolats H167 à H212 appartenant au groupe G5.	92
<b>Tableau 26.</b> Caractéristiques physiologiques des isolats H213 à H262 appartenant au groupe G5.	95
<b>Tableau 27.</b> Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des isolats H231, H232 et H238 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomonospora</i> .	103
<b>Tableau 28.</b> Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches représentatives du cluster IV avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Nocardiopsis</i> .	106
<b>Tableau 29.</b> Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches du cluster VI avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Saccharomonospora</i> .	107
<b>Tableau 30.</b> Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches H137, H149, H206 et H225 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Prauserella</i> .	107
<b>Tableau 31.</b> Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches représentatives du cluster I avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Actinopolyspora</i> .	111
<b>Tableau 32.</b> Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches représentatives du cluster V avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Saccharopolyspora</i> .	112
<b>Tableau 33.</b> Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches H150, H151, H195 et H199 avec les souches-types des genres et des espèces les plus proches .	113
<b>Tableau 34.</b> Signatures des séquences nucléotidiques présentes dans le gène codant pour l'ARNr 16S des souches H195, H150, H151 et H199 ( <i>Mzabimycetaceae</i> ) et des représentants des familles les plus proches ( <i>Pseudonocardiaceae</i> et <i>Actinopolysporaceae</i> ).	115
<b>Tableau 35.</b> Propriétés antagonistes des souches d'actinobactéries halophiles.	130
<b>Tableau 36.</b> Fréquences des gènes PKS-I, PKS-II, PKSE et NRPS impliqués dans la synthèse de biomolécules chez les actinobactéries halophiles inactives sur milieu solide ISP2.	135

## Index des Figures

<b>Figure 1.</b> Dendrogramme montrant les relations phylogéniques entre les différentes familles de la classe des actinobactéries, établi sur la base de l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S (Kämpfer, 2010). La barre indique 0,10 substitution par position de nucléotide.	6
<b>Figure 2.</b> Micromorphologie de quelques espèces d'actinobactéries halophiles (observations faites au microscope électronique à balayage).	9
<b>Figure 3.</b> Organisation du gène codant pour l'ARNr 16S.	17
<b>Figure 4.</b> Synthèse d'une polycétone (Katz et Donodio, 1993).	38
<b>Figure 5.</b> Structure d'une PKS de type I modulaire (Bacha, 2009).	39
<b>Figure 6.</b> Structure d'une PKS de type I itérative (Bacha, 2009).	39
<b>Figure 7.</b> Actinorhodine synthase, PKS de type II (Bacha, 2009).	40
<b>Figure 8.</b> PKS de type III (Khosla <i>et al.</i> , 1999).	41
<b>Figure 9.</b> Minimum de domaines requis dans une NRPS (Bacha, 2009).	42
<b>Figure 10.</b> Les trois types de biosynthèse.	43
<b>Figure 11.</b> Lieux de prélèvements des échantillons de sols.	44
<b>Figure 12.</b> Micromorphologie du MA en microscopie optique de l'isolat H156 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).	69
<b>Figure 13a.</b> Micromorphologie du MA en microscopie optique de l'isolat H231 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).	70
<b>Figure 13b.</b> Micromorphologie du MS en microscopie optique de l'isolat H231 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40) montrant les spores isolées (flèches). La barre indique 5 µm.	70
<b>Figure 14.</b> Micromorphologie du MA en microscopie optique de l'isolat H223 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).	71
<b>Figure 15.</b> Micromorphologie du MS en microscopie optique de l'isolat H225 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).	72
<b>Figure 16.</b> Micromorphologie du MA en microscopie optique de l'isolat H195 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).	74



- Figure 17.** Exemple de mise en évidence de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) par chromatographie sur papier. 76
- Figure 18.** Exemple de mise en évidence des sucres par CCM (gel de silice). 76
- Figure 19.** Chromatographie bi-dimensionnelle par CCM sur gel de silice des lipides polaires des isolats H195 (groupe G5) (A: en haut) et H225 (groupe G4) (B: en bas) révélés par le bleu de molybdène, le molybdate acide phosphorique et l'anisaldéhyde. 78
- Figure 20.** Dendrogramme issu de l'analyse UPGMA de 63 caractères physiologiques montrant la relation entre elles des 91 souches d'actinobactéries mycéliennes halophiles isolées des sols sahariens. 98
- Figure 21.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S et montrant les relations des souches des clusters III et IV et les souches-types des espèces les plus proches des genres *Nocardiopsis* et *Streptomonospora*. 104
- Figure 22.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S et montrant les relations entre les souches des clusters II et VI et les souches-types des espèces les plus proches des genres *Saccharomonospora* et *Prauserella*. 108
- Figure 23.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S et montrant les relations entre les souches H195, H199, H150 et H151 avec les espèces-types des genres les plus proches, *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora*. 114
- Figure 24.** Micromorphologie du mycélium aérien en microscopie électronique à balayage de la souche H195 de *Mzabimyces algeriensis* cultivée pendant deux semaines à 30°C sur le milieu ISP2 additionné de 15% de NaCl. La micrographie montre des chaînes de spores à surface très rugueuse. La barre indique 1  $\mu\text{m}$ . 119

## Liste des publications

**Saker R.**, Bouras N., Zitouni A., Ghoul M., Rohde M., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2014). *Mzabimyces algeriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinobacterium isolated from a Saharan soil, and proposal of *Mzabimycetaceae* fam. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106:1021–1030.

**Saker R.**, Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2015). *Prauserella isguenensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65:1598–1603.

**Saker R.**, Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2015). *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov., A novel halophilic actinomycete isolated from northern Sahara. *Current Microbiology*, 70:423–428.

**Saker R.**, Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2015). Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic *actinobacteria* in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. *Annals of Microbiology*, in press, DOI 10.1007/s13213-015-1065-6.

Un exemplaire de chaque publication est donné à la fin du manuscrit.

## Liste des communications

**Saker R.**, Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Sabaou N. (2014). Diversité et propriétés antagonistes des actinobactéries halophiles isolées des sols des régions arides d'Algérie. Dixièmes Journées Scientifique de Microbiologie, 14-16 Novembre 2014, Société Tunisienne de Microbiologie, Tunisie.

**Saker R.**, Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2014). Diversité et propriétés antagonistes des actinobactéries halophiles isolées des sols des régions du M'zab et des Zibans et mise en évidence d'un nouveau genre. Premier colloque international de biotechnologie végétale et microbienne, 2-3 Décembre 2014, université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, Algérie.

Bouras N., Meklat A., Boubetra D., **Saker R.**, Boudjelal F., Aouiche A., Lamari L., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2014). Diversity of actinobacteria in Algerian saharan soil and description of sixteen new taxa. 1er Congrès International sur le milieu aride, 9-11 décembre 2014, université de Ghardaia, Algérie.

**Saker R.**, Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2014). Nouveau genre et nouvelles espèces d'actinobactéries halophiles des sols des régions du M'zab et des Zibans. Première journées de biologie des systèmes microbiens, 14-15 décembre 2014, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Algérie.

## الملخص

تطرقنا في هذه الأطروحة إلى عزل بكتيريا هيفية محبة للملوحة *Actinobactéries halophiles* من أترية مالحة لمناطق وادي ميزاب، بسكرة، المسيلة وبوغزول (المدية)، صنّفناها ودرسنا قدراتها التضادية على بعض الكائنات الدقيقة الممرضة. هدفنا من خلال هذه الدراسة الى البحث عن بكتيريا هيفية جديدة وانتقاء المنتجة منها لمضادات حيوية هامة من خلال استعمال 24 عينة ترابية متوسطة الى عالية الملوحة ووسطين زراعيين، هما: « وسط معقد آغار *complexe medium agar* » و« كيتين-فيتامينات آغار *chitine-vitamines agar* » يحوي كل منهما 15 و 20% من NaCl. تمكّنا من عزل 91 سلالة محبة للملوحة حيث رتبناها اعتمادا على التصنيف المتعدّد الأوجه *Taxonomie polyphasique* القائم على أسس شكلية، ووظيفية، وكيميائية وجزئية (تحديد تتابع نيوكليوتيدات المورثة المشفرة لل-ARNr 16S والدراسة الفيلوجينية). بيّنت النتائج تواجد 7 أجناس، منها 6 معروفة، هي: *Actinopolyspora*، *Nocardiopsis*، *Prauserella*، *Saccharomonospora*، *Saccharopolyspora* و *Streptomonospora*، وجنس جديد سمّيناه *Mzabimyces*. تحصّلنا على 3 أنواع جديدة، هي: *Mzabimyces algeriensis* (ينتمي الى جنس جديد وفصيلة جديدة *Mzabimycetaceae*)، *Actinopolyspora biskrensis* (سمّي نسبة الى بسكرة) و *Prauserella isguenensis* (سمّي نسبة الى بني إزقن بغرداية).

إختبرنا القدرة التضادية للـ 91 سلالة على الوسط الزراعي ISP2 ضد تسع كائنات دقيقة أغلبها ممرضة للإنسان أو للنبات أو مفرزة للسموم (بكتيريا، خمائر وفطريات خيطية). بيّنت النتائج المتحصل عليها امتلاك 69 منها فعالية تضادية، خاصة ضد الفطريات. ووجدنا أن 19 من بين الـ 22 سلالة غير الفعالة تحتوي على الأقل نوع من المورثات المنتجة للجزئيات الفعالة حيويًا، خاصة PKS-II و NRPS.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا هيفية محبة للملوحة، أترية صحراوية، تصنيف متعدّد الأوجه، أصنوفات جديدة، قدرات تضادية.

## Résumé

Des travaux ont été entrepris sur la taxonomie et les potentialités antagonistes des actinobactéries halophiles des sols salés des régions du M'zab, de Biskra, de M'sila et de Boughezoul (Médéa) en vue de rechercher de nouveaux taxons et de déceler des souches à activités antibiotiques intéressantes contre divers microorganismes pathogènes. Vingt quatre échantillons de sols modérément salés à très salés ont été prélevés au niveau de ces régions puis analysés. Les actinobactéries ont été dénombrées et isolées sur milieux « complexe medium agar » et « chitine-vitamines agar » contenant chacun 15 et 20% de NaCl. Au total, 91 souches d'actinobactéries halophiles ont été prélevées et ont fait l'objet d'une étude taxonomique polyphasique, sur la base des caractéristiques morphologiques, physiologiques, chimiques et moléculaires (séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et études phylogénétiques). Les résultats ont montré la présence de 7 genres, dont 6 sont connus: *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Prauserella*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* et *Streptomonospora*, et un genre nouveau appelé *Mzabimyces*. Trois nouvelles espèces ont été obtenues: *Mzabimyces algeriensis* (appartenant à un nouveau genre et une nouvelle famille, *Mzabimycetaceae*), *Actinopolyspora biskrensis* et *Prauserella isguenensis*.

Les potentialités antagonistes des 91 souches d'actinobactéries halophiles ont été évaluées sur milieu ISP2 vis-à-vis de neuf microorganismes (bactéries, levures et champignons filamenteux) dont la plupart sont pathogènes ou toxigènes pour l'Homme, ou encore phytopathogènes. Les résultats ont montré que 69 souches ont une activité antibiotique (surtout antifongique). Sur les 22 souches inactives, 19 possèdent au moins un type de gène pour la production de molécules bioactives, surtout les PKS-II et les NRPS.

**Mots clés:** actinobactéries halophiles, sols sahariens, taxonomie polyphasique, nouveaux taxons, potentialités antagonistes.

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION GENERALE

Les actinobactéries sont des microorganismes procaryotes ayant un pourcentage de guanine-cytosine élevé (supérieur à 55%) qui les différencie des autres bactéries. En outre, elles forment phylogénétiquement une branche à part et sont caractérisées par une très grande diversité morphologique, pouvant aller de la forme cocci à la forme mycélienne parfaite (Goodfellow, 2012). Si la plupart des actinobactéries sont chimioorganotrophes, mésophiles, neutrophiles, non halophiles et non fixatrices d'azote, il existe cependant une diversité physiologique étonnante puisque l'on retrouve également des thermophiles, des psychrophiles, des alcalophiles, des acidophiles, des halophiles, des fixateurs d'azote, etc. (Goodfellow *et al.*, 2012). Cette grande diversité métabolique fait que les actinobactéries soient retrouvées pratiquement partout dans l'environnement où elles ont pu coloniser plusieurs milieux, y compris les plus extrêmes et où la vie était considérée comme étant impossible (Tiwari et Gupta, 2013).

L'importance des actinobactéries a de tout temps été soulignée dans divers domaines: dans le domaine industriel, dans le domaine médical et vétérinaire, dans l'agriculture et l'agro-alimentaire, etc. (George *et al.*, 2012; Solecka *et al.*, 2012). Les actinobactéries, surtout celles qui ont une structure mycélienne, sont réputées pour la production d'antibiotiques, en particulier le genre *Streptomyces* qui sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (Solecka *et al.*, 2012) mais aussi d'autres genres que l'on retrouve peu fréquemment ou parfois même rarement (Tiwari et Gupta, 2011). D'autres molécules bioactives sont également sécrétées par ce groupe microbien, telles que les enzymes, les vitamines, les immunosuppresseurs, les insecticides, les herbicides, etc. (Genilloud *et al.*, 2011). Si la plupart des actinobactéries sont utiles, certaines sont pathogènes pour l'homme et les animaux ou encore pour les plantes (Locci, 1994; McNeil et Brown, 1994; Solecka *et al.*, 2012).

Les chercheurs s'évertuent à isoler perpétuellement de nombreuses souches d'actinobactéries de divers milieux, surtout des milieux où les conditions de vie sont très difficiles (sols salés, sols alcalins, sols acides, marais salants, sols pollués par du pétrole, etc.), en vue de découvrir de nouveaux taxons et également de nouvelles molécules bioactives ayant des activités intéressantes (Solecka *et al.*, 2012).

La recherche des actinobactéries productrices de molécules bioactives se fait par des screening, parfois à grande échelle, pour espérer trouver les souches sécrétant des composés très intéressants et

capables de faire face à la résistance de plus en plus croissante et inquiétante des microorganismes pathogènes aux antibiotiques, phénomène qui a pris de l'ampleur durant ces dernières années (Huttner *et al.*, 2013). Ces tests peuvent être des screening classiques (ex: méthodes des stries croisées, des cylindres d'agar, de la double couche, etc.) sur milieux de culture qu'il s'agit par la suite d'optimiser, ou encore, comme cela se fait surtout ces dernières années, des screening moléculaires, en recherchant, par exemple, des produits bioactifs par le biais de la voie des « polyketides synthases » ou PKS, et par la voie des « non-ribosomal peptide synthetases » ou NRPS (Metsä-Ketelä *et al.*, 1999; Ayuso-Sacido et genilloud, 2005). La recherche des gènes impliqués dans la biosynthèse des composés actifs chez les actinobactéries permet de prédire la structure de ces composés et augmente ainsi la probabilité de découverte de nouveaux médicaments.

Parmi les actinobactéries, celles qui sont halophiles ou halotolérantes suscitent de plus en plus d'intérêt, aussi bien du point de vue taxonomique que du point de vue intérêt biotechnologique. Ainsi, les actinobactéries halophiles sont connues pour la sécrétion de composés antimicrobiens (Murphy *et al.*, 2010; Mahyudin *et al.*, 2012), antiviraux (Sonya et Galal, 2005) et anticancéreux (He *et al.*, 2001; Suthindhiran et Kannabiran, 2009), ainsi que de composés à activité insecticide dont certains, comme le « Spinosad » (mélange des molécules bioactives spinosynes A et D), sont commercialisés depuis longtemps (Kirst *et al.*, 1992).

Les bactéries halophiles sont aussi connues pour la production de diverses enzymes (Ventosa *et al.*, 2005; Zhang et Kim, 2010), d'inhibiteurs d'enzymes (Imada 2005), de solutés compatibles comme la bêtaïne, l'ectoïne, etc. (Nieto et Vargas, 2002), de composés détoxifiants (Al-Mueini *et al.*, 2007), etc.

Depuis la découverte de la première actinobactérie halophile (*Actinopolyspora halophila*) par Gochnauer (1975), les recherches se sont intensifiées dans ce sens pour essayer de rechercher de nouveaux taxons. Dans ce domaine, la palme revient sans contexte aux équipes chinoises dont certains laboratoires se sont spécialisés dans la taxonomie des actinobactéries et surtout celle du groupe des halophiles. Ainsi, en plus des genres halophiles (ou bien dont certaines espèces sont halophiles) connus comme *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Prauserella*, *Streptomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, etc. (Goodfellow *et al.*, 2012), plusieurs autres genres halophiles ont été découverts ces dernières années par les équipes chinoises, tels que *Haloactinospora* (Tang *et al.*, 2008), *Spinactinospora* (Chang *et al.*, 2011), *Haloglycomyces* (Guan *et al.*, 2009), *Haloechothrix* (Tang *et al.*, 2010), *Haloactinopolyspora* (Tang *et al.*, 2011a), *Yuhushiella* (Mao *et al.*, 2011), *Salinactinospora* (Chang *et al.*, 2012), etc. Ces chercheurs ont pour

cela choisi des environnements salins (sols, marais, mers, etc.) et utilisé des milieux de cultures appropriés.

En Algérie, les sols sahariens et semi-arides se sont révélés très diversifiés en actinobactéries et de nombreux travaux ont été publiés sur ces microorganismes, du point de vue taxonomique dans le but de découvrir de nouvelles espèces (Zitouni *et al.*, 2004; Boubetra *et al.* 2013a,b et 2015; Aouiche *et al.*, 2015; Bouras *et al.*, 2015), de mise en évidence d'une activité antimicrobienne ou de découverte de nouveaux antibiotiques (Boudemagh *et al.*, 2005; Kitouni *et al.*, 2005; Badji *et al.*, 2006; Bouras *et al.*, 2008; Boudjella *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2010, 2011; Boughachiche *et al.*, 2012; Boubetra *et al.*, 2013c; Aouiche *et al.*, 2014; Toumatia *et al.*, 2014; Driche *et al.*, 2015; Yekkour *et al.*, 2015; etc.) ou encore dans une optique de lutte biologique contre certaines maladies des plantes ou d'amélioration de la croissance des plantes (Aouar *et al.*, 2012; Yekkour *et al.*, 2012; Goudjal *et al.*, 2013a,b).

En ce qui concerne le groupe des actinobactéries halophiles, les sols sahariens se sont révélés tout aussi intéressants, surtout du point de vue taxonomique où plusieurs espèces originales appartenant aux genres *Actinopolyspora* (*A. algeriensis*, *A. saharensis*, *A. righensis* et *A. mzabensis*), *Saccharopolyspora* (*Sc. ghardaiensis*), *Streptomonospora* (*St. algeriensis*) (Meklat *et al.*, 2012a; Meklat *et al.*, 2013a,b,c; Meklat *et al.*, 2014a,b) et *Actinoalloteichus* (*A. hoggarensis*) (Boudjelal *et al.*, 2015) ont été découvertes durant ces dernières années. Un nouveau genre extrêmement halophile, provenant d'un sol d'El-Goléa, dont l'espèce a été nommée *Bounagaea algeriensis*, a même été très récemment décrit (Meklat *et al.*, 2015).

En considérant cette richesse des sols sahariens en actinobactéries halophiles, nous avons entrepris de continuer les travaux dans ce sens, en ciblant particulièrement certaines régions sahariennes (sols salés du M'zab et de la région de Biskra), mais aussi des sols salés des régions de M'sila et de Médéa (Boughezoul), pour essayer de découvrir d'autres taxons originaux et également de mettre en évidence les potentialités antagonistes de ce groupe de bactéries contre divers microorganismes pathogènes.

Le présent travail comporte les parties suivantes:

Une introduction suivie d'une partie bibliographique en rapport avec la taxonomie des actinobactéries, avec une mention spéciale pour celles qui sont halophiles, objet de notre travail, ainsi que les potentialités antagonistes de ce groupe de microorganismes (screening classique et moléculaire).

Une partie relative au matériel utilisé et aux méthodes employées, avec plus de détails au niveau des annexes.



Une partie relative aux résultats et discussions portant sur la distribution, l'isolement et la taxonomie polyphasique des actinobactéries halophiles, aboutissant à la découverte de nouveaux taxons. Dans cette partie, les potentialités antagonistes des actinobactéries halophiles, par des techniques classiques et des techniques moléculaires, notamment la recherche de gènes codant pour les PKS et les NRPS, ont été évaluées.

Une conclusion générale et des perspectives.

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. TAXONOMIE DES ACTINOBACTERIES

### 1. Critères d'identification des actinobactéries et taxonomie générale

La taxonomie des actinobactéries est basée sur un ensemble de caractères morphologiques, physiologiques, chimiotaxonomiques et génomiques. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le Manuel de Bergey, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, dont le plus récent comprend un volume en deux parties dédié aux *Actinobacteria* (Goodfellow *et al.*, 2012).

#### 1.1. Définition des actinobactéries et classification supragénérique

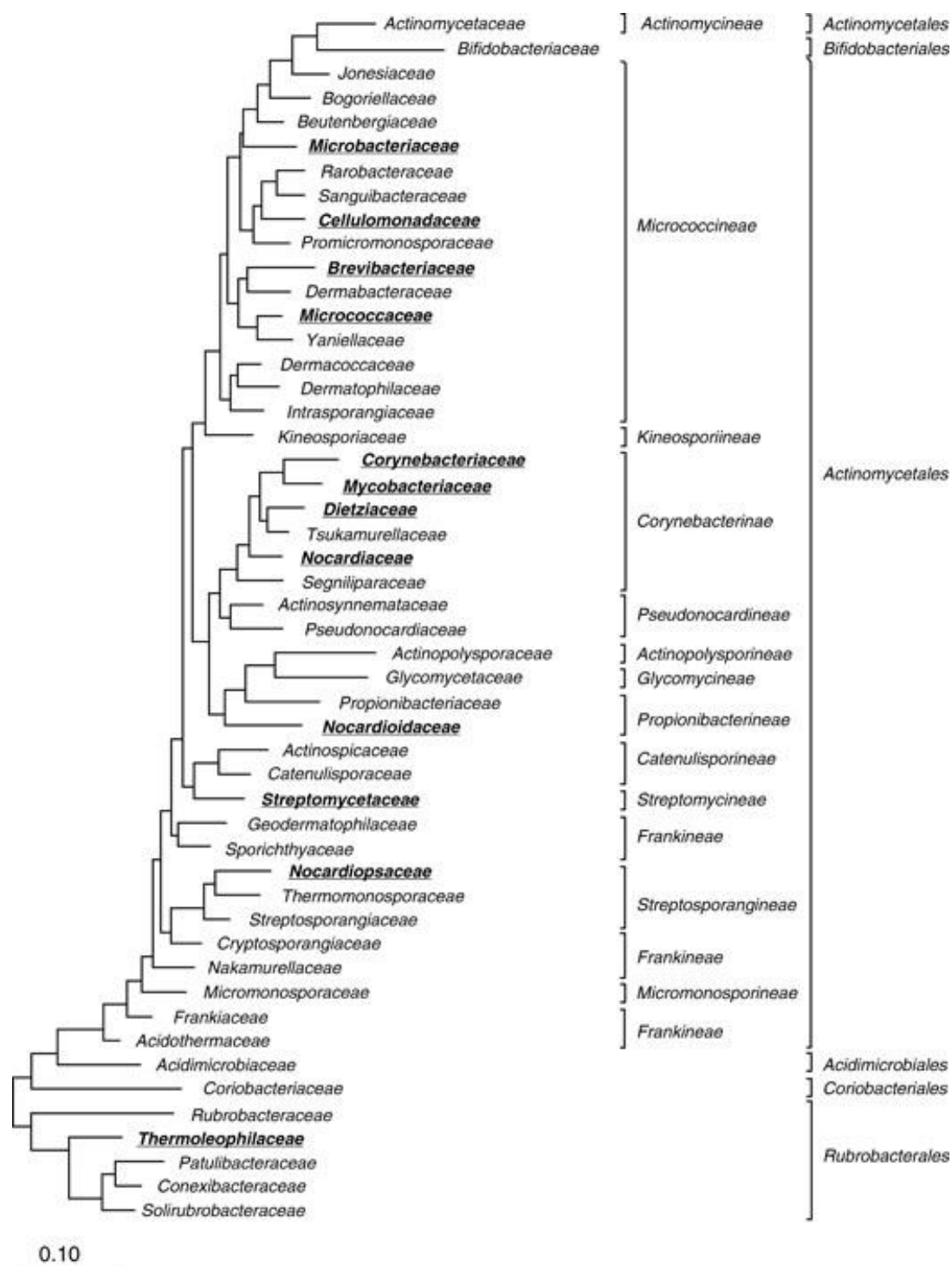
##### 1.1.1. Définition

Les actinobactéries sont encore appelées actinomycètes. Elles étaient auparavant considérées comme étant des bactéries à Gram positif capables de former des spores asexuées (conidiospores ou sporangiospores) et des hyphes ramifiés non fragmentés ou fragmentés. Leur développement donnait lieu à des colonies circulaires constituées de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973; Lechevalier et Lechevalier, 1981). Ceci explique leur dénomination «actinomycètes» du Grec « aktino, mycetes » ou « champignons à rayons » ou encore « champignons rayonnants » (Gottlieb, 1973). Les actinobactéries étaient classées dans l'ordre des *Actinomycetales* (Mariat et Sebald, 1990). Certains représentants de ces microorganismes, surtout les aérobies, ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de leur morphologie fongicoïdes (filaments ramifiés, organes de sporulation etc.) (Becker *et al.*, 1965) et de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (Gazenko *et al.*, 1998).

Ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (Becker *et al.*, 1965; Lechevalier et Lechevalier, 1981) et ont un pourcentage de guanine-cytosine (G+C%) supérieur à 55%.

##### 1.1.2. Classification supragénérique

Jusqu'à ces dernières années, les actinobactéries étaient classées dans plus de 50 Familles (Figure 1). Le principal Ordre, celui des *Actinomycetales* regroupait à lui seul environ 45 familles et près de 290 genres (Kämpfer, 2010).



**Figure 1.** Dendrogramme montrant les relations phylogéniques entre les différentes familles de la classe des actinobactéries, établi sur la base de l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S (Kämpfer, 2010). La barre indique 0,10 substitution par position de nucléotide.

Dans le manuel de Bergey de 2012, en tenant compte de la phylogénie et des signatures des nucléotides, l'ordre des *Actinomycetales* a été scindé en plusieurs ordres (Tableau 1). En effet, les anciens sous-ordres définis en ce temps ont été élevés au rang d'ordres, et d'autres ordres ont aussi été créés.

Les actinobactéries sont classées dans le Domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria*, le Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria* et la Sous-Classe des *Actinobacteridae* (Euzéby, 2015). Le phylum des actinobactéries comprend maintenant cinq classes, 21 ordres et de nombreuses familles (Tableau 1). Les genres sont caractérisés par une diversité morphologique importante, allant du simple cocci (ex: *Micrococcus*) à des formes mycéliennes qui peuvent être fragmentées ou non. Ainsi, la position taxonomique des actinobactéries, en prenant comme exemple l'espèce *Actinopolyspora algeriensis* décrite par Meklat *et al.* (2012a), s'établit comme suit:

Classe: *Actinobacteria*

Ordre: *Pseudonocardiales*

Sous-Ordre: *Actinopolysporineae*

Famille: *Actinopolysporaceae*

Genre: *Actinopolyspora*

Espèce: *Actinopolyspora algeriensis*

## 1.2. Critères morphologiques

Les caractères morphologiques importants permettant de différencier les genres d'actinobactéries entre eux, sont les suivants:

### 1.2.1. Caractères macromorphologiques

Les caractères macromorphologiques reposent sur une observation à l'œil nu. Il s'agit de noter :

- La production ou non du mycélium aérien (MA).
- La présence ou non du mycélium du substrat (MS).
- La couleur du MA, du MS et des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs, telle par exemple, la charte de Kelly et Judd (1976) ou « Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC –NBS ».

**Tableau 1.** Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries (Goodfellow *et al.*, 2012)

<b>Classes</b>	<b>Ordres</b>	<b>Familles</b>
<b><i>Actinobacteria</i></b>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
	<i>Actinopolysporales</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>
	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
	<i>Catenulisporales</i>	<i>Catenulisporaceae, Actinospicaceae</i>
	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae, Dietziaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Segniliparaceae, Tsukamerullaceae</i>
	<i>Frankiales</i>	<i>Frankiaceae, Acidothermaceae, Cryptosporangiaceae, Geodermatophilaceae, Nokamurellaceae</i>
	<i>Glycomycetales</i>	<i>Glycomycetaceae</i>
	<i>Jiangellales</i>	<i>Jiangellaceae</i>
	<i>Kineosporales</i>	<i>Kineosporaceae</i>
	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae, Beutenbergiaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabacteriaceae, Dermacoccaceae, Dermatophilaceae, Intrasporangiaceae, Jonesiaceae, Micobacteriaceae, Promicomonosporaceae, Rarobacteriaceae, Ruaniaceae</i>
	<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae, Nocardidoidaceae</i>
	<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
	<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
	<i>Streptosporangiales</i>	<i>Streptosporangiaceae, Nocardiopticaceae, Thermomonosporaceae</i>
<b><i>Acidimicrobiia</i></b>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Actinomicrobiaceae</i>
<b><i>Nitriliruptoria</i></b>	<i>Nitriliruptorales</i>	<i>Nitriliruptoraceae</i>
	<i>Euzebyales</i>	<i>Euzebyaceae</i>
<b><i>Rubrobacteria</i></b>	<i>Rubrobacterales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>
<b><i>Thermophilia</i></b>	<i>Thermophilales</i>	<i>Thermophilaceae</i>
	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Solirubrobacteraceae, Conexibacteraceae, Patulibacteraceae</i>

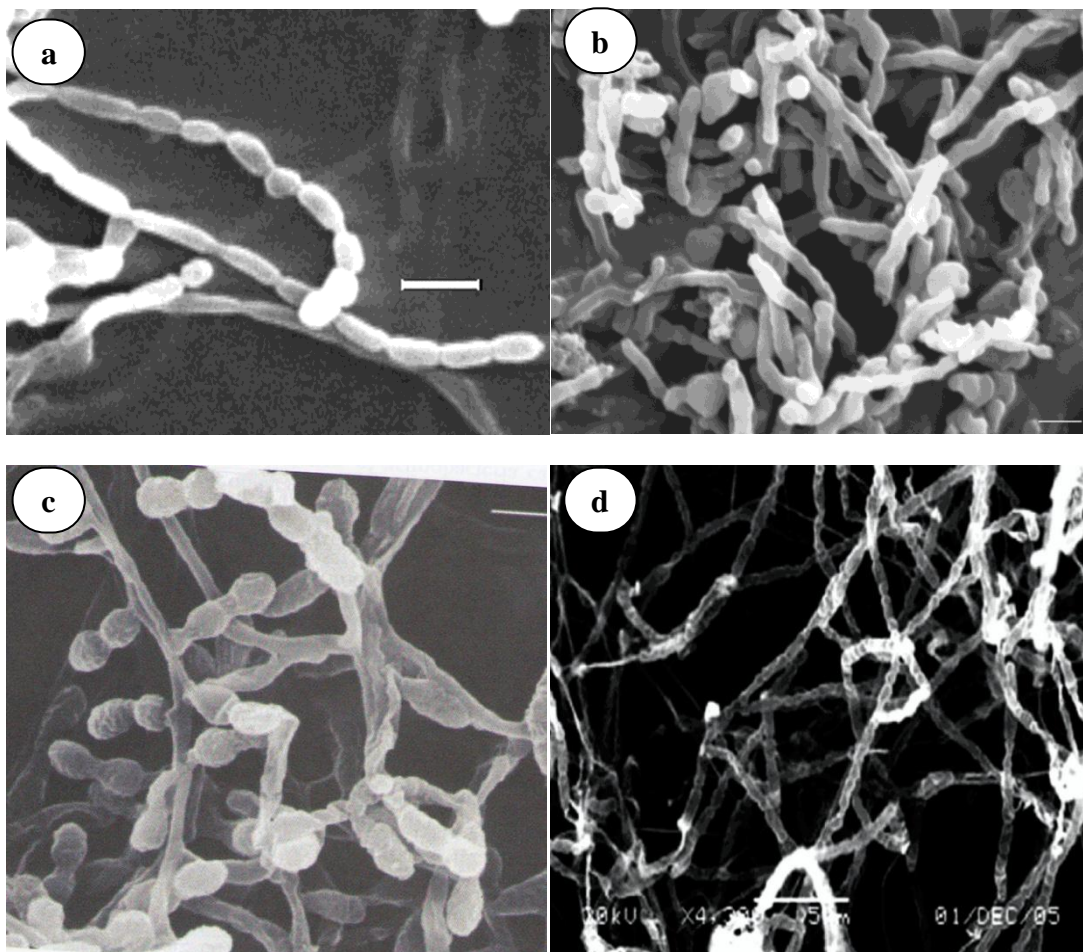
### 1.2.2. Caractères micromorphologiques

La micromorphologie des actinobactéries est réalisée par observation au microscope optique (et parfois électronique) des colonies poussant sur milieux gélosés. Il s'agit de noter:

- La fragmentation ou non du MS.
- La présence ou non, sur le MA et/ou le MS, de spores, leur agencement (isolées, par deux ou en chaînes), la forme des chaînes de spores et l'ornementation de la surface des spores.
- La présence de structures particulières comme les sporanges et les synnemata sur le MA.

La surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) est quant à elle observée au microscope électronique à balayage

La figure 2 montre, à titre d'exemple, la micromorphologie de quelques genres principaux d'actinobactéries halophiles.



**Figure 2.** Micromorphologie de quelques espèces d'actinobactéries halophiles (observations faites au microscope électronique à balayage).

a: *Nocardioopsis sinuspersici* HM6<sup>T</sup> (Hamedi *et al.*, 2010).

b: *Saccharopolyspora indica* VRC122<sup>T</sup> (Vaddavalli *et al.*, 2014).

c: *Saccharomonospora halophila* 8<sup>T</sup> (Al Zarban *et al.*, 2002c).

d: *Actinopolyspora alba* YIM 90480<sup>T</sup> (Tang *et al.*, 2011b).

### 1.3. Critères physiologiques

#### 1.3.1. Caractères physiologiques utilisés

L'étude physiologique des actinobactéries consiste en des tests de dégradation de différents composés (glucides, lipides, protéines, polymères complexes, stéroïdes, etc.), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents chimiques), la tolérance au pH, à la température, à la salinité, etc.

#### 1.3.2. Taxonomie numérique

En 1763, le botaniste français Adanson proposait une méthode de classification qui tenait compte de l'ensemble des caractères d'un organisme. A la fin des années 1950, suite au développement des techniques biochimiques analytiques, Sneath (1957) applique une méthode similaire aux bactéries et développe une taxonomie qualifiée de numérique ou d'adansonienne. De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, de 70 à 200 (ou parfois plus) caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques, etc. et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Les degrés de similitude entre individus sont finalement représentés sous forme de dendrogrammes, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables. Ces degrés sont définis par un indice de similarité dont les plus utilisés en microbiologie sont ceux de Sokal et Michener ou de Jaccard (Sneath, 1989). Une fois les distances entre les taxons ainsi définies, ceux-ci sont progressivement regroupés ou au contraire séparés entre eux (classification hiérarchique ascendante ou descendante) pour aboutir à des groupes ou "clusters" et à des sous-groupes ou "sub-clusters" (De Lagarde, 1983). Cette procédure d'agrégation ou de séparation progressive permet d'aboutir à un dendrogramme final qui illustre les degrés de ressemblances entre les taxons. Il a été admis, en ce temps, que les taxons appartenant à la même espèce montrent un degré de similarité (en utilisant le coefficient de Sokal et Michener) supérieur à 80 ou 85% (Sneath, 1989). Les caractères métaboliques et physiologiques ont dès lors été largement employés en taxonomie.

L'application de cette méthode de classification pour les actinobactéries a connu son apogée entre 1970 et 1990. En effet, la taxonomie numérique a apporté énormément de clarté dans la reconnaissance, auparavant très confuse, des espèces et a mis en évidence les caractères discriminants (Goodfellow, 1971; Orchard et Goodfellow, 1980; Goodfellow et Pirouz, 1982; Athalye *et al.*, 1985; Grund et Kroppenstedt, 1990; etc.). Elle a même permis la création de genres, tel *Rhodococcus* (Goodfellow et Alderson, 1977). Cependant, l'exemple le plus édifiant concernant l'apport considérable de ce type d'analyse reste sans contexte le cas des *Streptomyces* dont le nombre



d'espèces a été réduit de 463 (Pridham et Tresner, 1974) à 142 (Williams *et al.*, 1989). Le plus intéressant est que les chercheurs avaient noté une corrélation satisfaisante entre les résultats obtenus lors de la taxonomie numérique et ceux obtenus par les critères moléculaires et chimiotauxonomiques.

Cependant, cette méthode a depuis, été délaissée au profit des critères moléculaires, notamment, les études phylogénétiques basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), et aussi, l'hybridation ADN-ADN.

#### 1.4. Critères chimiques

Ces critères consistent en la détermination de la composition cellulaire en acides aminés pariétaux, en glucides totaux, en phospholipides, en ménaquinones et en acides gras membranaires, et également en acides mycoliques pariétaux.

##### 1.4.1. Composition pariétale en acides aminés

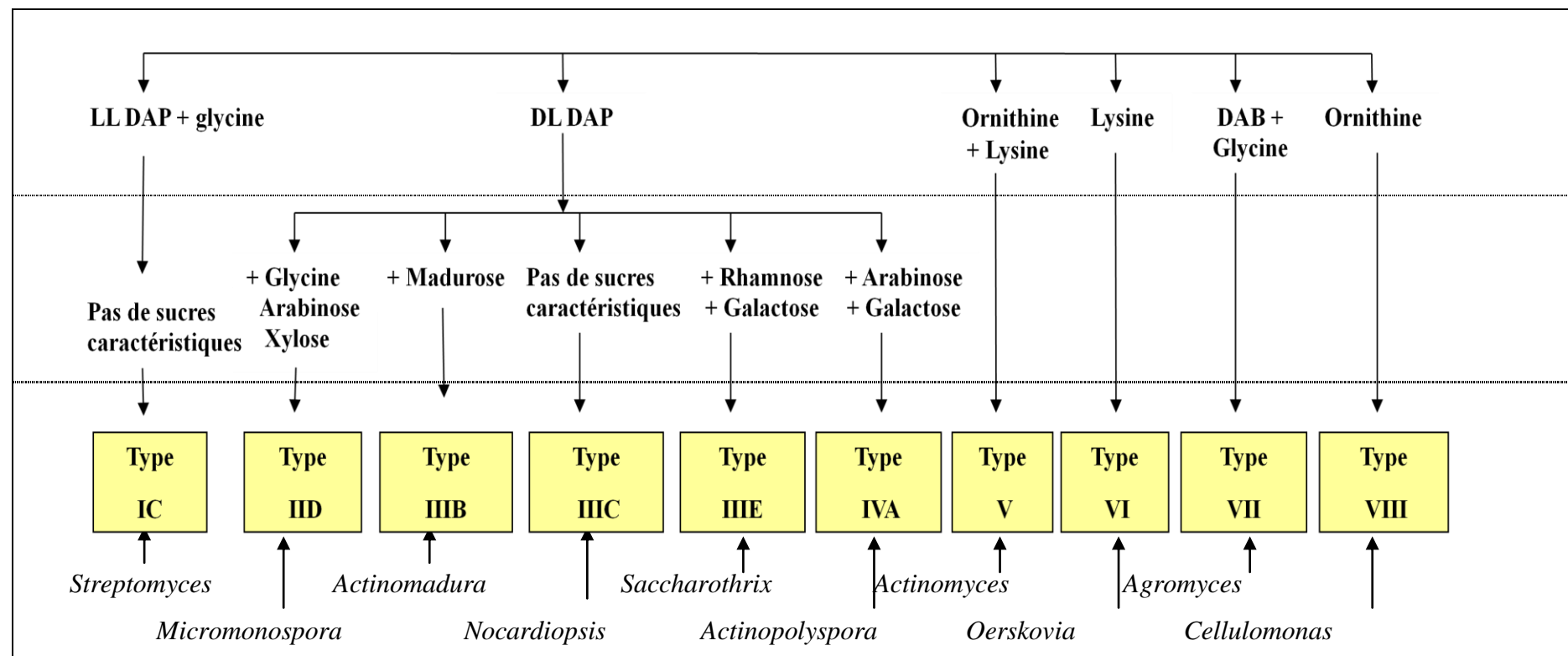
La muréine, ou peptidoglycane, est un composant majeur de la paroi des bactéries à Gram +, dont les actinobactéries. L'analyse des acides aminés qui la constituent est utilisée pour déterminer des chimiotypes. Deux acides aminés sont taxonomiquement très importants pour les actinobactéries mycéliennes, l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous deux formes, LL ou DL (méso) selon les genres et la glycine qui peut être présente ou absente. Cette dernière forme des liaisons "ponts" entre les sous-unités peptidiques de la muréine (Becker *et al.*, 1964 et 1965; Yamaguchi, 1965 ; Labeda *et al.*, 1984). Chez certaines actinobactéries non mycéliennes, le DAP est remplacé par la lysine ou bien par l'ornithine ou encore par l'acide diaminobutyrique.

Selon la composition en acides aminés, les actinobactéries sont classées dans les chimiotypes I à VIII ( Tableau 2).

##### 1.4.2. Composition cellulaire en sucres

Divers sucres ont été retrouvés dans les cellules des actinobactéries, dont certains ont une importance taxonomique et ont permis de définir divers types. Ces sucres sont les couples "arabinose-galactose" (= type A) (*Nocardia*, *Actinopolyspora*, *Prauserella*, etc.), "arabinose-xylose" (= type D) (*Micromonospora*, *Actinoplanes*, etc.), "rhamnose-galactose" (= type E) (*Saccharothrix*, *Lentzea*, etc.) et madurose ou 3-O-méthyl-galactose (= type B) (*Actinomadura*, *Streptosporangium*, etc.). En dehors de ces sucres, d'autres, considérés comme non caractéristiques, peuvent être retrouvés (= type C). Ce sont en général le ribose, le mannose, et le galactose quand il n'est pas

**Tableau 2.** Chimiotypes rencontrés chez les actinobactéries



**Note:** +: présent, -: absent, Gly: glycine, DAP: acide diaminopimélique, DAB: acide diaminobutyrique.

- I, II, III et IV sont définis par Becker *et al.*, (1965), Yamaguchi (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970), en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diaminopimélique et la présence ou non de glycine.

- A, B, C, D et E sont définis par Lechevalier et Lechevalier (1970), Labeda *et al.* (1989) et Stackebrandt *et al.* (1994), en se basant sur la présence ou non des sucres suscités.

couplé à l'arabinose ou au rhamnose). Sur la base de la composition des cellules en acides aminés (Becker *et al.*, 1965; Yamagushi, 1965) et en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970, Labeda *et al.* 1989 et Stackebrandt *et al.* 1994), huit chimiotypes ont ainsi été définis (Tableau 2).

### 1.4.3. Compositions membranaire et pariétale en lipides

Chez certains genres d'actinobactéries, la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour leur identification. L'analyse des lipides est un autre élément qui, tout comme le type de paroi cellulaire, fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification microbienne. Les lipides taxonomiquement importants peuvent être répartis en trois groupes: les lipides contenant une partie polaire (phospholipides), les ménaquinones, les acides gras et parfois les acides mycoliques (Lechevalier et Lechevalier, 1980; Collin *et al.*, 1977).

#### 1.4.3.1. Les phospholipides

Ce sont des lipides polaires présents au niveau des membranes cellulaires. Leur analyse a permis à Lechevalier *et al.* (1977) de distinguer cinq profils phospholipidiques lesquels sont résumés dans le Tableau 3 ci-dessous.

**Tableau 3.** Types de phospholipides caractéristiques présents chez les actinobactéries (Lechevalier *et al.*, 1977).

Types de phospholipides	PE	PC	PG	PGI	Exemples
PI	-	-	-	v	<i>Actinomadura, Spirillospora</i>
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces, Pseudonocardia</i>
PIII	-	+	-	v	<i>Actinopolyspora, Amycolatopsis, Nocardiosis</i>
PIV	+	-	+	-	<i>Nonomuraea, Prauserella, Saccharopolyspora,</i>
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia</i>

**Note:** PE: phosphatidyléthanolamine; PC: phosphatidylcholine; PG: phospholipides contenant de la glucosamine; PGI: phosphatidylglycérol. +: présent; -: absent; v: variable suivant les espèces et les souches.

#### 1.4.3.2. Les acides gras

La composition des membranes cellulaires en acides gras permet également de distinguer entre certains genres (Minnikin *et al.*, 1980 et 1984). Elle est utilisée en combinaison avec d'autres

critères chimiques lorsque le cas s'impose. Leurs types et leurs pourcentages sont caractéristiques de plusieurs genres (Grund et Kroppenstedt, 1990; Kroppenstedt *et al.*, 1990) comme le montre ci-dessous le Tableau 4.

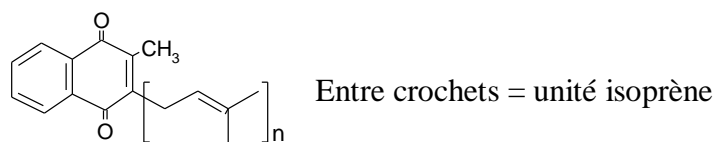
**Tableau 4.** Profils des acides gras chez les actinobactéries (Kroppenstedt, 1985).

Type de profil	Acides gras à chaînes ramifiées							
	Saturé	Insaturé	Iso 14/16/18	Iso 15/17	Antéiso 15/17	10-Méthyl		Cyclo propane
						17	18	
<b>1a</b>	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<b>1b</b>	+++	+++	-	-	-	-	+	-
<b>1c</b>	+++	+++	-	-	-	-	-	++
<b>2a</b>	++	+	+++	+	(+)	-	-	-
<b>2b</b>	(+)	+	++	+++	+	-	-	-
<b>2c</b>	+	(v)	+++	+	+++	-	-	-
<b>2d</b>	+	+	+++	+++	+++	-	-	-
<b>3a</b>	+++	++	+++	(+)	(+)	(+)	+++	-
<b>3b</b>	+	+	+++	+++	++	++	(+)	-
<b>3c</b>	+	+	++	+	+	+++	(+)	-
<b>3d</b>	+	+	+++	++	+++	(+)	+++	-

**Note:** +++: très présent; ++: moyennement présent; +: faiblement présent; (+): présent avec un taux inférieur à 5%; -: absent; (v): variable.

### 1.4.3.3. Les ménaquinones

Les ménaquinones sont des composés lipidiques membranaires constitués d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne aliphatique contenant des unités isoprènes. Elles sont classées suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (Collins *et al.*, 1980). La variation dans la longueur et le degré de saturation de la chaîne latérale des ménaquinones leur a donné une importance dans la chimiotaxonomie (Collins, 1985). Ex: ménaquinone MK-10(H<sub>2</sub>) présente chez *Nocardiosis*: ménaquinone avec dix unités isoprènes dont deux sont hydrogénées. Leur structure générale est la suivante:



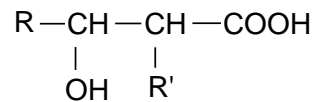
Sur la base de la présence de certaines ménaquinones, Kroppenstedt (1985) a désigné 11 types (Tableau 5).

**Tableau 5.** Principaux types de ménaquinones retrouvées chez les actinobactéries (Kroppenstedt (1985)).

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

#### 1.4.3.4. Les acides mycoliques

Les acides mycoliques sont des lipides pariétaux complexes et insaturés contenant 20 à 90 atomes de carbone. Ils sont importants uniquement pour différencier certaines actinobactéries ayant le chimiotype IVA (Mordarska *et al.*, 1972), comme par exemple le genre *Nocardia* (46-64 atomes de carbone) et *Williamsia* (50-56 atomes de carbone) (Goodfellow *et al.*, 2012). Leur structure générale est la suivante:



R et R' sont des chaînes de CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>.

### 1.5. Critères moléculaires

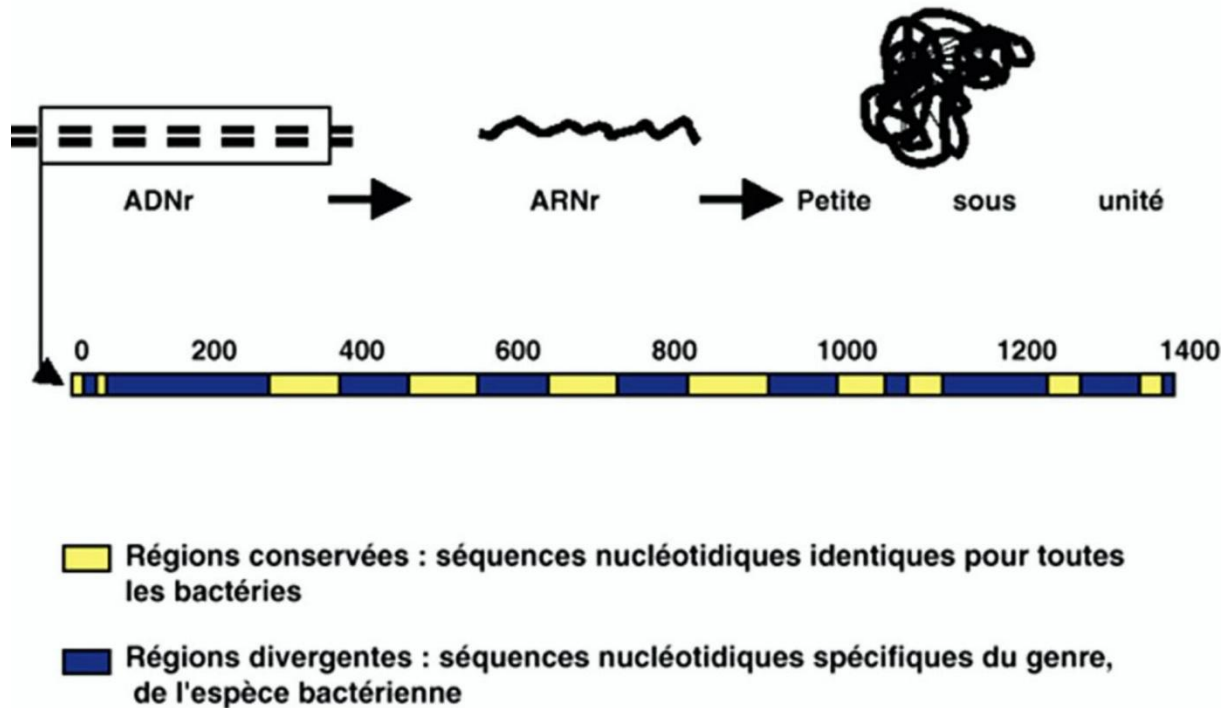
Ces dernières décennies, la biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant et incontournable en taxonomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer une nouvelle espèce sans effectuer des analyses génétiques. Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S et l'hybridation ADN-ADN. Le pourcentage de G+C n'est obligatoirement demandé que lors d'une proposition d'un nouveau genre.

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

Woese et Fox (1977) soulignent que l'évolution a un rythme quasi indépendant des changements de phénotypes (théorie neutraliste de l'évolution). Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique ou phylogénétique en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles. Woese (1987) a ainsi choisi l'ARNr 16S en tant qu'outil pour la classification phylogénétique et l'identification bactérienne pour plusieurs raisons:

- Sa présence est universelle et y accomplit le même rôle chez tous les organismes.
- Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient et permettent de comparer des espèces très proches sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés (Figure 3).
- Il a évolué lentement au cours du temps, vraisemblablement en raison de son rôle dans la physiologie bactérienne.
- Il n'est pas le résultat de transferts latéraux.

- Il est préféré au 5S et au 23S en raison de sa taille moyenne et sa structure secondaire moins marquée. Sa séquence est suffisamment longue pour réaliser des comparaisons statistiquement cohérentes.



**Figure 3.** Organisation du gène codant pour l'ARNr 16S.

Le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (d'une taille de l'ordre de 1500 paires de bases) commence par l'extraction de l'ADN génomique puis une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de ce gène en utilisant des amorces spécifiques. Par la suite, le produit de la PCR est utilisé pour séquencer la partie propre au gène codant pour l'ARNr 16S. Les séquences obtenues après amplification sont soumises à des études de comparaison (ou encore phylogénie) entre elles ou bien avec des espèces de références répertoriées dans des banques de données génomiques, telle par exemple, la GenBank.

Stackebrandt *et al.* (1981 et 1983) sont les premiers à avoir utilisé ces techniques pour la taxonomie des actinobactéries. Pour effectuer ce genre d'étude, plusieurs méthodes de calculs ont été mises au point et sont disponibles sous forme de programmes informatisés gratuits sur le Web (Philip, Clustal W, etc...). Ces programmes mettent à disposition plusieurs outils de traitement des séquences nucléotidiques, comme les outils d'inversion des séquences, d'alignement (simple ou

multiple), de conversion entre les différents formats des fichiers des séquences, des outils de recherche et de comparaison avec les banques de données génomiques (ex: "BLAST"), etc.

Pour les études phylogéniques, d'autres programmes sont aussi disponibles. Ils incluent les méthodes de calcul des matrices des distances d'évolution (ex: Jukes et Cantor, 1969; Kimura, 1980, etc.), celles des algorithmes de construction des topologies des arbres phylogénétiques telles que les méthodes de "Parsimony" (Fitch, 1972), du "Maximum Likelihood" (Felsenstein, 1981) et du "Neighbor-Joining" (Saitou et Nei, 1987), ainsi que les méthodes de validation statistique des liens phylogéniques (ex: le "Bootstrap") (Felsenstein, 1985). Les algorithmes disponibles transforment les profils obtenus en dendrogrammes de similitudes. À présent, la base de données la plus complète est celle du gène codant pour l'ARNr 16S concernant plus de 90% des genres décrits.

La généralisation de l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S a incité les auteurs à corréliser les pourcentages d'identité entre les séquences de ce gène et les pourcentages de réassociations ADN/ADN. Il a ainsi été mis en évidence que des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S ayant des similarités inférieures à 97% ne correspondaient jamais à des pourcentages de réassociation ADN/ADN supérieurs à 70% (Stackebrandt et Goebel, 1994). Par extension, il est généralement admis que des séquences partageant moins de 97% de similarité correspondent à des espèces différentes.

Cependant, récemment, une proposition a été faite pour élever ce seuil, d'abord à 98,2% par Meier-Kolthoff *et al.* (2013), puis, par la suite, à 98,65% par Kim *et al.* (2014) dans un article paru, il faut le souligner, dans la revue *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (d'où son importance pour la validation de ces résultats). Ces derniers auteurs ont pu montrer, suite à une analyse statistique très fine, que les séquences qui partagent moins de 98,65% de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S correspondent à des espèces différentes. En effet, la corrélation des pourcentages d'homologie entre les séquences de ce gène et les pourcentages de réassociation ADN-ADN a montré que les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S ayant des similarités inférieures à 98,65% ne correspondaient pas à des pourcentages de réassociation ADN-ADN égaux ou supérieurs à 70%. Si le pourcentage d'homologie est supérieur à 98,65%, le placement ou pas de deux souches dans une même espèce dépend des résultats de l'hybridation ADN-ADN.

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a permis de découvrir plusieurs genres et espèces, tels que *Lentzea* (Yassin *et al.*, 1995), *Streptomonospora* (Cui *et al.*, 2001), *Jiangella* (Song *et al.*, 2005), *Umezawaea* (Labeda et Kroppenstedt, 2007) *Phytohabitans* (Inahashi *et al.*, 2010), *Jishengella* (Xie *et al.*, 2011), etc. Par ailleurs, cette méthode a été utilisée pour regrouper les genres d'actinobactéries dans des taxons supérieurs tels que les familles et les sous-ordres en se



basant sur la présence des bases (signatures) conservées dans des sites bien déterminés pour chaque famille ou sous-ordre. L'appartenance de plusieurs genres à une famille ou plusieurs familles doit être validée par la présence de plus de 95% des séquences de nucléotides « signatures » dans le même groupe (Stackebrandt, 1997; Zhi *et al.*, 2009). Le Tableau 6 montre les signatures des principales familles des actinobactéries.

**Tableau 6.** Signatures basées sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de certaines familles des actinobactéries (Goodfellow *et al.*, 2012).

Familles	Position des signatures dans l'ARNr 16S
<i>Actinospicaceae</i>	127:234 (G-C), 129:232 (C-G), 344 (G), 449 (C), 450:483 (C-G), 560 (U), 576 (G), 590:649 (C-G), 591:648 (U-R), 859 (G), 952:1229 (C-G), 1122:1151 (G-C), 1123:1150 (U-G), 1124:1149 (A-U).
<i>Corynebacteriaceae</i>	250 (U), 316:337 (U-G), 418:425 (C-G), 586:755 (U-G), 599:639 (C-G), 662:743 (U-G), 987:1218 (G-C), 1059:1198 (U-A).
<i>Frankiaceae</i>	139:224 (G-C), 148:174 (A-G), 155:166 (U-G), 839:847 (A-G), 987:1218 (G-C), 1059:1198(C-G), 1308:1329 (C-G).
<i>Micrococcaceae</i>	293:304 (G-U), 610 (G), 598:640 (U-U), 615:625 (G-C), 839:847 (A-U), 859 (U), 1025:1036 (C-G), 1026:1035 (C-G), 1265:1270 (U-G), 1278 (U).
<i>Nocardiaceae</i>	250 (U), 316:337 (C-G), 418:425 (C-G), 580:761 (U-A), 559:639 (C-G), 662:743 (C-G), 987:1218 (G-C), 1000:1040 (A-U).
<i>Nocardiopsaceae</i>	440:497 (U-U), 485 (G), 501:544 (G-C), 502:543 (A-U), 833:853 (U-G), 1355:1367 (G-C).
<i>Propionibacteriaceae</i>	328 (U), 407:435 (C-G), 451 (A), 453 (G), 819 (G), 825:875 (A-U), 827 (C), 828 (U), 832:854 (U-C), 833:853 (G-U), 844 (U).
<i>Actinopolysporaceae</i>	127:234 (A-U), 242:284 (C-G), 480 (U), 564 (C), 657:759 (G-C), 672:734 (C-G), 828 (A), 829:857 (G-C), 831:855 (U-G), 832:854 (G-U), 833:853 (U-G), 840:846 (C-G), 952:1229 (U-A), 986:1219 (U-A), 1100 (U), 1117:1183 (G-C), 1309:1328 (G-U).
<i>Pseudonocardiaceae</i>	127:234 (G-C), 242:284 (G-A), 480 (U), 564 (U), 657:759 (U-A), 672:734 (U-G), 828 (A), 829:857 (G-C), 831:855 (U-G), 832:854 (G-U), 833:853 (U-G), 840:846 (C-A), 952:1229 (U-A), 986:1219 (U-A), 1100 (A), 1117:1183 (U-U), 1309:1328 (G-C).
<i>Streptomycetaceae</i>	127:234 (G-C), 449 (A), 672:734 (C-G), 950:1231 (U-G), 952:1229 (U-A), 955:1225 (C-G), 965 (C), 986:1219 (A-U), 1362 (C).
<i>Streptosporangiaceae</i>	440:497 (C-G), 485 (U), 501:544 (C-G), 502:543 (G-C), 833:853 (U-G), and 1355:1367 (A-U).

### 1.5.2. Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN est une méthode qui permet d'estimer le degré de parenté entre deux microorganismes. En utilisant les ADN des souches de référence, le taux de réassociation ADN-ADN permet de déterminer si la souche analysée représente une nouvelle espèce ou non. Les souches appartenant à la même espèce auront plus de 70% d'homologie ADN-ADN (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt et Goebel, 1994).

Cependant, ces dernières années, le séquençage du génome entier des actinobactéries (et autres procaryotes) commence à prendre de l'ampleur et des banques de données sont en train d'être progressivement construites. De ce fait, d'ici quelques années cette technique pourra être généralisée et utilisée ainsi à la place du séquençage du gène codant pour l'ARN 16S, mais aussi à la place de l'hybridation ADN-ADN dont les limites et la corrélation avec le séquençage du génome entier ont été montrées très récemment par Li *et al.* (2015).

### 1.5.3. Pourcentage en guanine-cytosine

En 1949, Chargaff *et al.* montrent que le contenu en bases puriques et pyrimidiques de l'ADN pouvait varier d'un individu à un autre mais était constant pour les individus d'une même espèce. Le contenu en base d'un ADN est exprimé par le pourcentage de guanine-cytosine (G+C%). Chez les bactéries, cette valeur est très dispersée et varie de 25 à 75%. Actuellement, on admet que des microorganismes dont les G+C% diffèrent de plus de 5% ne peuvent appartenir à une même espèce, et que des microorganismes dont le G+C% diffèrent de plus de 10% ne peuvent appartenir à un même genre. Bien entendu, des valeurs identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être distribuées de manière très différente sur l'ADN.

Grace au pourcentage de guanine-cytosine, la définition des actinobactéries (dont l'ADN contient un pourcentage supérieur à 55%) a été reconsidérée. Ceci a permis de différencier la lignée des actinobactéries de celle des firmicutes comprenant les *Bacillaceae*, les *Lactobacillaceae* et d'autres bactéries à Gram positif (G+C inférieur à 55%). De même, d'autres bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus*, sont considérées comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinobactéries. En revanche, certaines bactéries mycéliennes, telles que *Thermoactinomyces*, ont été exclues des actinobactéries pour être incluses parmi les firmicutes et ce, suite à leur pourcentage de G+C qui s'est révélé être inférieur à 55%.

## **2. Taxonomie des actinobactéries halophiles**

### **2.1. Définition de l'halophilie et l'halotolérance**

Les microorganismes halophiles et halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique. On les trouve parmi les trois domaines du vivant: Archaea, Bacteria et Eucarya (Oren, 2002). Ils sont capables de survivre dans des conditions extrêmes de salinité. Cette contrainte est à la base des propriétés halophiles de ces organismes et de leurs composants, qui doivent fonctionner en présence de concentrations multimolaires de sel à l'intérieur de leur cellule.

De nombreuses définitions ont été données dans la littérature pour qualifier les termes « halotolérant » et « halophile ». Elles sont basées sur la réponse de la croissance des microorganismes en présence du chlorure de sodium (NaCl). Il est parfois difficile d'établir des limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance car de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence de certains nutriments, et/ou la présence d'autres sels, modifient considérablement la réponse des bactéries au NaCl. Le terme « halophile » désigne les microorganismes nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En revanche, le terme « halotolérant » signifie que les microorganismes tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance. Les bactéries nécessitant moins de 1% (w/v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles.

En 1978, Kushner a défini 5 catégories de bactéries halophiles selon la concentration en sels qui amène à une croissance optimale des microorganismes. Cette concentration peut varier de 1,16 à 2,9% (w/v) pour les bactéries faiblement halophiles, de 2,9 à 14,5% (w/v) pour les bactéries halophiles modérées, 8,7 à 23,2% pour les bactéries halophiles "limite" et de 14,5 à 30% (w/v) pour les bactéries halophiles extrêmes (Tableau 7). Par ailleurs, les bactéries halotolérantes tolèrent des concentrations modérées en sel mais celui-ci n'est pas obligatoire pour leur croissance.

En 1986, Larsen a défini 3 catégories de bactéries halotolérantes: les faiblement halotolérantes poussant entre 0 et 1,25 M de NaCl (0 à 7,25%), les halotolérantes modérées, poussant entre 0 et 1,72 M de NaCl(0-10%) et les halotolérantes extrêmes, poussant entre 0 et 2,5 M de NaCl (0-14,5%).

**Tableau 7.** Classification des microorganismes en fonction de leur tolérance au NaCl (Kushner, 1978).

Groupe	Concentration de NaCl (M)	Exemples*
Non halophile	<0,2 (<1,16%)	La plupart des eubactéries Les actinobactéries marines;
Faiblement halophile	0,2 à 0,5 (1,16-2,9%)	<i>Nocardiopsis</i> ; <i>Saccharomonospora marina</i> .
Modérément halophile	0,5 à 2,5 (2,9-14,5%)	<i>Nocardiopsis kunsanensis</i> ; <i>Actinopolyspora alba</i> ; <i>Actinopolyspora erythraea</i> .
Halophile extrême "Limite"	1,5 à 4,0 (8,7-23,2%)	<i>Actinopolyspora halophila</i> ; <i>Saccharomonospora halophila</i> .
Halophile extrême	2,5 à 5,2 (14,5-30%)	<i>Halobacterium salinarium</i> ; <i>Halococcus morrhuae</i> .
Halotolérant	0 à 2,5 (0-14,5%)	<i>Nocardiopsis halotolerans</i> , <i>N. nikkonnensis</i> .

**Note:** \* exemples de genres et d'espèces tirés à partir de données bibliographiques récentes.

## 2.2. Actinobactéries halophiles

La première souche d'actinobactérie halophile extrême a été isolée fortuitement par Gochnauer en 1975, à partir d'une contamination d'une culture d'halobactérie ensemencée sur un milieu à 25% de NaCl et fut nommée *Actinopolyspora halophila*. Depuis cette date, une diversité phylogénique des actinobactéries halophiles a été décrite et classée dans diverses familles et divers genres.

### 2.2.1. Famille des *Actinopolysporaceae*

Cette famille comprend un seul genre, *Actinopolyspora*, décrit par Gochnauer *et al.* (1975), avec la description d'*Actinopolyspora halophila* comme espèce-type. Aujourd'hui, ce genre comprend 12 espèces halophiles, à savoir *A. halophila* (Gochnauer *et al.*, 1975), *A. mortivallis* (Yoshida *et al.*, 1991), *A. xinjiangensis* (Guan *et al.*, 2010), *A. egyptensis* (Hozzein *et al.*, 2011), *A. alba* et *A. erythraea* (Tang *et al.*, 2011b), *A. algeriensis* (Meklat *et al.*, 2012a), *A. saharensis* (Meklat *et al.*, 2013a), *A. righensis* (Meklat *et al.*, 2013b), *A. mzabensis* (Meklat *et al.*, 2013c), *A. lacussalsi* (Guan *et al.*, 2013a) et *A. dayingensis* (Guan *et al.*, 2013b). En général, les membres du genre sont caractérisés par une fragmentation du mycélium aériens (MA) en éléments en bâtonnets plus en moins longs. Il forme des chaînes de spores plus ou moins longues et droites à flexueuses.

Chimiotaxonomiquement, ce genre possède dans ses cellules l'isomère DL de l'acide diaminopimélique (DAP), de l'arabinose et du galactose comme sucres caractéristiques (chimiotype IVA) et des phospholipides de type PIII (phosphatidylcholine comme phospholipide caractéristique). Les ménaquinones prédominantes sont les MK-9(H<sub>4</sub>) et MK-9(H<sub>6</sub>). Le pourcentage en G+C varie entre 64 et 68%.

### **2.2.2. Famille des *Nocardiopsaceae***

Cinq des neuf genres classés dans la famille des *Nocardiopsaceae* présentent des espèces halophiles, à savoir le genre *Nocardiopsis*, *Streptomonospora*, *Haloactinospora*, *Salinactinospora* et *Thermobifida* (Meyer *et al.* 1976; Cui *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2008; Yang *et al.* 2008; Chang *et al.* 2012).

#### **2.2.2.1. *Nocardiopsis***

Le genre *Nocardiopsis*, genre-type de la famille des *Nocardiopsaceae*, a d'abord été décrit par Meyer en 1976 et comprend actuellement 44 espèces valides. Les membres du genre *Nocardiopsis* sont ubiquitaires (Kroppenstedt et Evtushenko, 2006). Le MA se fragmentant de manière anarchique (sans sporophore distinct) en chaînes de spores en "zig-zag". Le MS est plus ou moins fragmenté. La paroi cellulaire est de type IIIC (DL DAP et absence de glycine et de sucres caractéristiques) (Lechevalier et Lechevalier, 1970) et les phospholipides de type PIII (phosphatidylcholine comme lipide caractéristique) (Lechevalier *et al.*, 1977). Les acide gras sont de type 3d: à chaînes ramifiées iso, antéiso et 10-méthylés (Kroppenstedt, 1985) et les ménaquinones de type MK-10 avec un degré variable de saturation dans la chaîne latérale (Kroppenstedt, 1992). Le taux de G+C est compris entre 64 et 69% (Grund et Kroppenstedt, 1990).

#### **2.2.2.2. *Streptomonospora***

Ce genre, décrit pour la première fois par Cui *et al.* (2001), contient actuellement 9 espèces qui poussent en présence d'une concentration en NaCl allant de 10 à 15% (w/v). Le MS est très ramifié et n'est pas fragmenté. Des spores rondes à ovales et isolées, sont portées par des sporophores dichotomiques sur le MS. Le MA forme à maturité des chaînes de spores courtes avec des spores ovales ou en bâtonnets. Ce genre est caractérisé par la présence dans ses cellules de la forme DL de DAP, ne contient pas de sucres caractéristiques (chimiotype IIIC) et ses phospholipides sont du type PIII (la phosphatidylcholine est le phospholipide caractéristique). Le taux de G+C varie entre 71,2 et 74,4%.

### 2.2.2.3. *Haloactinospora*

*Haloactinospora alba* a été isolée d'un lac salé du Xinjiang, Chine, par Tang *et al.* (2008). Le MA forme à maturité de longues chaînes de spores bacillaires à surface lisse. Des chaînes de spores formant des pseudosporanges sont présentes sur le MS. L'unique espèce du genre est caractérisée par la présence dans ses cellules de la forme DL de DAP, et contient du galactose et du ribose. La phosphatidylcholine est le phospholipide caractéristique. Les principaux acides gras sont iso-C<sub>16:0</sub> et anteiso-C<sub>17</sub>. Le taux de G+C est de 68%.

### 2.2.2.4. *Thermobifida*

Le genre *Thermobifida* contient une seule espèce halotolérante, *Thermobifida halotolerans* (Yang *et al.*, 2008). Cette espèce est caractérisée par la présence dans ses cellules de la forme DL de DAP et du galactose, du xylose et du glucose comme sucres. Les ménaquinones prédominantes sont MK-10(H<sub>6</sub>) et MK-10(H<sub>8</sub>) et les principaux acides gras sont iso-C<sub>16:0</sub> et anteiso-C<sub>17:0</sub>.

### 2.2.2.5. *Salinactinospora*

Le genre *Salinactinospora* contient une seule espèce qui s'avère être halophile, *Salinactinospora qingdaonensis* (Chang *et al.*, 2012). Son MS se fragmente et le MA présente de longues chaînes de spores à surface à lisse. L'espèce-type est caractérisée par la présence dans ses cellules de la forme DL de DAP et du glucose et xylose comme principaux sucres. Les phospholipides détectés sont le diphosphatidylglycérol, le phosphatidylglycérol ainsi que des phospholipides, des glycolipides et des lipides non identifiés. MK-10(H<sub>8</sub>), MK-9(H<sub>8</sub>), MK-10(H<sub>2</sub>) et MK-10(H<sub>6</sub>) sont les ménaquinones prédominantes. Les principaux acides gras sont iso-C<sub>16:0</sub>, anteiso-C<sub>17:0</sub> et C<sub>16:0</sub>. La teneur en G+C de l'ADN est de 60,1%.

## 2.2.3. Famille des *Pseudonocardiaceae*

Six des vingt neuf genres classés dans la famille des *Pseudonocardiaceae* présentent des espèces halophiles, à savoir le genre *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Prauserella*, *Haloechothrix* et *Yuhushiella*.

### 2.2.3.1. *Saccharopolyspora*

Ce genre comprend 28 espèces, dont seulement huit sont halophiles: *S. halophila* (Tang *et al.*, 2009a), *S. qijiaojingensis* (Tang *et al.*, 2009b), *S. salina* (Suthindhiran et Kannabiran, 2009), *S. lacisalsi* (Guan *et al.*, 2011a) *S. ghardaiensis* (Meklat *et al.*, 2014b), *S. cavernae* (Cheng *et al.*, 2013), *S. dendranthema* (Zhang *et al.*, 2013) et *S. halotolerans* (Lv *et al.*, 2014). Les espèces du

genre sont caractérisées par la présence du DL DAP et de l'arabinose et du galactose comme sucres caractéristiques. La phosphatidylcholine est le phospholipide caractéristique. Le taux de G+C est de 66-77%.

### **2.2.3.2. *Saccharomonospora***

Le genre *Saccharomonospora* (Nonomura et Ohara, 1971) contient onze espèces, dont cinq sont halophiles ou halotolérantes: *Sm. halophila*, première espèce halophile de ce genre (Al Zarban *et al.*, 2002c), *Sm. paurometabolica* (Li *et al.*, 2003b), *Sm. saliphila* (Syed *et al.*, 2008), *Sm. marina* (Liu *et al.*, 2010) et *Sm. oceani* (Zang *et al.*, 2013). Le genre est très facilement reconnaissable par sa micromorphologie, avec des spores sessiles isolées sur le MA et disposées de manière opposée ou alternée de part et d'autre du filament mycélien. Le MS n'est pas fragmenté. Ce genre a une paroi de type IVA (présence de DL DAP et arabinose et galactose) et des phospholipides de type PII. Le pourcentage de G+C varie de 68,1 à 71,8%.

### **2.2.3.3. *Prauserella***

Le genre *Prauserella*, décrit par Kim et Goodfellow (1999), comprend onze espèces dont huit sont halophiles ou halotolérantes (Li *et al.*, 2003b; Li *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Le MS est très ramifié et se fragmente en éléments en bâtonnets irréguliers. Le MA est produit chez quelques espèces uniquement et donne des chaînes de spores courtes, droites à flexueuses et ramifiées. De longues chaînes de spores peuvent se former à maturité. La paroi est de type IVA et les phospholipides, de type PIII. Le taux de G+C est de 65,8 à 69,9%.

### **2.2.3.4. *Haloechothrix* et *Yuhushiella***

Le genre *Haloechothrix* a été créé récemment par Tang *et al.* (2010b), avec comme espèce-type *H. alba*, isolée du lac du Xinjiang. L'unique espèce de ce genre est halophile (croissance en présence de 9 à 23% de NaCl avec un optimum à 15%). Le mycélium du substrat se fragmente en éléments en bâtonnets sans former de spores et le mycélium aérien est épineux. Chimiquement, il se distingue par une paroi de type IIIC (DL DAP et pas de sucres caractéristiques) et des phospholipides de type PII. Le taux de G + C est de 68,1%.

Le genre *Yuhushiella* a été créé récemment par Mao *et al.* (2011), avec comme espèce-type *Y. deserti*, isolée du désert de Xinjiang. L'unique espèce de ce genre est halotolérante. Elle forme un MS produisant des pseudosporanges. La paroi est du type IVA et les phospholipides du type PII. Le taux de G + C est de 69,9%.

#### 2.2.4. Espèces appartenant à d'autres genres

De nombreuses espèces d'actinobactéries halophiles et surtout halotolérantes ont été citées dans la littérature. On peut citer par exemple les espèces halophiles du genre *Micromonospora* (Sudnitsyn, 2008), ainsi que *Haloactinopolyspora* (famille des *Jiangellaceae*) (Tang *et al.*, 2011a), *Haloglycomyces* (Guan *et al.*, 2009), *Amycolatopsis* (Tang *et al.*, 2010a) et *Glycomyces* (Guan *et al.*, 2012).

## II. DISTRIBUTION DES ACTINOBACTÉRIES DANS L'ENVIRONNEMENT

### 1. Les actinobactéries en général

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants, et en particulier le sol (Tableau 8) (Lacey, 1973; Williams *et al.*, 1984). Dans le sol, de nombreuses actinobactéries sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons. Les actinobactéries du sol sont surtout présents en surface, mais on peut les retrouver aussi à plus de 2 m de profondeur (Sabaou *et al.*, 1992). Elles produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsable de l'odeur caractéristique des sols (Zaitlin *et al.*, 2003; Zaitlin et Watson, 2006). Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50%, mais ces pourcentages peuvent parfois dépasser les 90% dans certains sols des palmeraies algériennes et surtout en profondeur (Sabaou *et al.*, 1992 ; Sabaou *et al.*, 1998). Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, surtout le premier genre qui peut représenter à lui seul 80 à 90% du total des actinobactéries mycéliennes (Sabaou *et al.*, 1998). Du point de vue quantitatif, le nombre d'actinobactéries mycéliennes par gramme de sol sec est de l'ordre de  $10^6$  à  $10^7$  dans les sols cultivés; ce nombre est beaucoup plus faible dans les sols des régions arides et plus élevé au niveau par exemple des sols rhizosphériques (Goodfellow et Williams, 1983; Sabaou *et al.* 1998; Lamari *et al.*, 2015).

Les actinobactéries ont été également isolées à partir de nombreux environnements aquatiques: eaux de mer, océans, sédiments marins (Jensen *et al.*, 1991; Ghanem *et al.*, 2000); eaux douces (Kitouni *et al.*, 2005) et eaux issues de marécages salés (Al-Zarban *et al.*, 2002c; Boughachiche *et al.*, 2005).

La majorité des actinobactéries préfèrent un pH neutre ou peu alcalin et sont mésophiles et non halophiles. Une proportion relativement faible peut être thermophile, psychrophile, halophile, acidophile ou alcalophile. Toutefois, différentes actinobactéries ont été isolées à partir



d'écosystèmes présentant des conditions de température, de pression, de teneur en sel et/ou de pH hostiles: sols polaires gelés, sols désertiques chauds et secs, pétrole brut, sols hautement contaminés par des métaux lourds, lacs extrêmement alcalins et lacs salés (Goodfellow et Williams, 1983; Meklat *et al.*, 2011).

Les actinobactéries sont responsables d'un certain nombre de maladies de l'homme et de l'animal (Pirouz *et al.*, 1999). Parmi les actinobactéries aérobies pathogènes, le genre *Nocardia* revêt une importance médicale particulière, de même que certains genres apparentés, tels que *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, etc. (Garrity *et al.* 2004; Van de Sande, 2013). Le mycétome, fréquemment observé en zone tropicale, constitue un cas particulier d'atteinte cutanée et sous-cutanée, et peut être dû à diverses espèces d'actinobactéries (*Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*) ainsi qu'à des champignons. Malgré le nombre important d'espèces de *Streptomyces*, seulement trois d'entre elles sont habituellement citées en pathologie humaine: *S. paraguayensis*, *S. griseus* et *S. somaliensis* (Borelli et Middelveen, 1986). Certaines mycobactéries sont la cause de pathologies animales, végétales et humaines, comme *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la tuberculose) ou *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre) (Veziris *et al.*, 2013). Enfin, certaines actinobactéries sont des symbiotes de plantes (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985). Ainsi, dans la rhizosphère, les actinobactéries appartenant au genre *Frankia* sont importantes pour de nombreux types de plantes. Cette bactérie est capable de fixer l'azote en formant des nodules au niveau des racines de certaines angiospermes, ce qui confère donc un avantage à la plante pour croître dans un sol pauvre en azote. Cette relation « plante-actinobactérie » est appelée association actinorhizienne (Prescott *et al.*, 2007). Peu d'espèces sont phytopathogènes, l'exemple le plus étudié étant *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre (Lindholm, 1997).

**Tableau 8.** Habitats de certaines actinobactéries (Williams *et al.*, 1984).

<b>Actinobactéries</b>	<b>Habitats</b>
<i>Actinoplanes</i> spp.	Eau douce, litière végétale, sol.
<i>Frankia</i> spp.	Nodules racinaires des non-légumineuses, sol.
<i>Micromonospora</i> spp.	Eau douce, sédiments, sols (humides ou non).
<i>Nocardia amarae</i>	Boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Déjections animales, eau, sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Foin moisi, sol.
<i>Streptomyces</i> spp.	Sol, litière végétale, eau.
<i>Saccharomonospora</i>	Compost, sol.

## 2. Les actinobactéries halophiles et halotolérantes

### 2.1. Distribution

Les actinobactéries halophiles et halotolérantes sont largement distribuées dans différents habitats tels que les déserts, les marais salants, les mines salées, les lacs hypersalés, les étangs, les aliments, les mangliers, etc. Les sols salins comprennent les déserts de sel, qui couvrent les régions du monde où l'évaporation dépasse largement les précipitations (Fitter et Hay, 1987). Ces sols salés représentent environ 15% des sols arides et semi-arides dans le monde, alors que les sols affectés par le sel représentent 40% des sols irrigués dans le monde (Hoffman *et al.*, 1980; Moore, 1984; Shannon 1984; Serrano et Gaxiola, 1994). Zvyaginstsev *et al.* (2009) ont rapporté que les solonchaks hydromorphiques, qui se forment à la surface des lacs salés et des sols de désert affectés par le sel, sont les plus peuplés en actinobactéries halophiles. Peu d'environnements salins, pourtant répandus dans le monde, sont exploités. La biodiversité en actinobactéries halophiles des lacs et des sols salés des provinces du Yunnan et du Xinjiang en Chine est la plus étudiée (Wu *et al.*, 2009). Plus de 2000 souches halophiles (optimum de croissance de 10 à 15% de NaCl) ont été isolées des sols de la région du Xinjiang (Tang *et al.*, 2010a,b). La plupart des espèces halophiles découvertes ces dernières années provient de ces environnements. En Algérie, les actinobactéries halophiles ont déjà été mises en évidence dans les sols très salés, moyennement salés ou peu salés du Sahara (Meklat *et al.*, 2011, Boudjelal, 2012 ; Meklat, 2012).

### 2.2. Mécanisme d'adaptation aux conditions salines

Dans la nature il est extrêmement rare de trouver un habitat composé d'une seule espèce ou lignée cellulaire. Différents microorganismes coexistent, interagissent entre eux et avec l'environnement qui les entoure et de ce fait même définissent la communauté. Cette dernière forme un système en constante évolution mais qui en même temps possède une certaine homéostasie qui reflète les interactions entre tous les membres de cette communauté et l'habitat qu'ils occupent (Alexander, 1997). Aussi, la vie dans les milieux hypersalés n'est possible qu'aux prix d'une forte spécialisation qui n'est atteinte que par quelques microorganismes, capables de maintenir une pression osmotique égale à celle de l'environnement. Deux stratégies sont utilisées pour s'adapter au milieu hypersalé et donc à une faible activité d'eau ( $A_w$ ).

### **2.2.1. Adaptation à la salinité par production d'osmoprotecteurs**

L'exclusion du sodium et la synthèse ou l'accumulation de solutés compatibles est une réponse au stress hyperosmotique adoptée par les microorganismes halophiles. Les solutés compatibles peuvent être des sucres (saccharose, tréhalose), des dérivés de sucres (sulfotréhalose, glucosylglycérol), certains acides aminés et dérivés (proline, acide glutamique, glutamine, acide aminobutyrique, glycine bêtaïne), ectoïne et dérivés et des polyalcools (glycérol, arabitol, mannitol). L'osmoprotecteur le plus fréquemment observé est la glycine bêtaïne (Courtenay *et al.*, 2000).

### **2.2.2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl**

Les microorganismes halophiles accumulent essentiellement du KCl (Oren, 1999; Oren *et al.*, 2002; Grant, 2004). L'exclusion du Na<sup>+</sup> du cytoplasme se fait grâce à un antiport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, localisé au niveau de la membrane cytoplasmique (Oren, 2001). Généralement, les ions <sup>+</sup> entrent passivement via un système uniport sous l'impulsion du potentiel de membrane. Ce système revient à remplacer une partie du sodium cellulaire par du potassium. L'afflux des cations doit être compensé par un nombre équivalent d'anions. Le mouvement d'anions tel que le chlorure est couplé à l'énergie du potentiel de membrane. Il pénètre grâce à un symport Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>. Les organismes accumulant dans leur cytoplasme de fortes quantités de sel, principalement du KCl, se soumettent à un nouveau stress cellulaire: le stress salin. Cependant, ces organismes ne semblent pas connaître ce stress, car leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles (stables, actives et flexibles) à de telles salinités, mais en plus, elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue. Elles sont en ce sens qualifiées de « protéines halophiles » (Brown-Peterson et Salin, 1994; Madern *et al.*, 2000). Une des questions les plus intéressantes serait de découvrir la base moléculaire de la stabilité des « protéines halophiles » à des concentrations de sel élevées car cela pourra élucider les mécanismes d'adaptation en général.

## **III. IMPORTANCE DES ACTINOBACTERIES HALOPHILES**

Les actinobactéries halophiles sont une source peu explorée et potentiellement intéressante pour la découverte de nouveaux métabolites secondaires bioactifs. La dégradation de composés organiques aliphatiques et aromatiques, la détoxification de polluants, la production de nouvelles enzymes et d'autres métabolites tels que les antibiotiques, les solutés compatibles et les polymères sont d'autres applications industrielles potentielles des actinobactéries halophiles et halotolérantes. Les nouveaux métabolites secondaires bioactifs produits par les actinobactéries halophiles, isolées

principalement des habitats marins, ont révélé la grande capacité de ce groupe physiologique dans la production de nouveaux composés bioactifs (Hamedi *et al.*, 2013).

## 1. Production de composés antimicrobiens, antiviraux et anticancéreux

Plusieurs sociétés de biotechnologie comme Diversa, Cubiste et Protéus, ainsi que des établissements universitaires travaillent actuellement sur de nouvelles stratégies pour les applications pharmaceutiques de nouveaux composés produits par les microorganismes marins et extrêmophiles dont les actinobactéries. Plusieurs antibiotiques produits par les actinobactéries marines ont été rapportés (Maskey *et al.*, 2003a,b; Charan *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Sujatha *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Adinarayana *et al.*, 2006; Lombo *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2010; Mahyudin *et al.*, 2012). *Saccharopolyspora spinosa* est une actinobactérie halophile qui sécrète deux produits à activité insecticide, la spinosyne A et la spinosyne D. Le produit commercialisé sous l'appellation de « Spinosad » (mélange des spinosynes A et D) est un insecticide qui agit comme une neurotoxine en empêchant l'acétylcholine de se lier aux sites récepteurs appropriés, provoquant ainsi la paralysie et la mort chez la plupart des insectes et des chenilles (Kirst *et al.*, 1992). *Streptomyces sannanensis*, une actinobactérie halophile et alcaliphile isolée à partir d'un sol alcalin, produit un antibiotique puissant contre les bactéries à Gram positif (Singh *et al.*, 2006). *Actinopolyspora mortivallis*, actinobactérie modérément halophile isolée d'un sol salé, sécrète un antibiotique nucléosidique (Yoshida *et al.* 1991). En outre, une souche halophile d'*Actinopolyspora* isolée à partir d'un sédiment marin a montré une bonne activité antimicrobienne (Kokare *et al.*, 2004). Quelques composés cytotoxiques sont également signalés chez les actinobactéries halophiles (Tableau 9). Par ailleurs, les lomaiviticines A et B sont des métabolites cytotoxiques puissants produits par la souche halophile LL-37I366 de *Micromonospora*. Les lomaiviticines ont montré une activité anticancéreuse contre un panel de cellules cancéreuses (He *et al.*, 2001). Un autre exemple est l'actinobactérie halophile modérée, *Saccharopolyspora salina* VITSDK4, qui nécessite une concentration de 9% de NaCl pour une croissance optimale et pour la production d'un composé extracellulaire ayant une cytotoxicité sur les cellules cancéreuses HeLa (Suthindhiran et Kannabiran, 2009b). Les actinobactéries extrêmophiles sont également considérées comme une source inexplorée de composés antifongiques (Phoebe *et al.* 2001). L'activité antivirale des actinobactéries halotolérantes est également signalée contre le virus de la mosaïque du tabac (Sonya et Galal, 2005).

**Tableau 9.** Quelques métabolites bioactifs décrits chez les actinobactéries halophiles ou halotolérantes.

Molécule bioactive	Espèce	Activité	Références
Spinosyne A et spinosyne D.	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Insecticide	Kirst <i>et al.</i> , 1992
Salinosporamides A et B	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancéreuse	Riedlinger <i>et al.</i> , 2004
Cyanosporacides A et B	<i>Salinispora pacifica</i>	Antibactérienne	Oh <i>et al.</i> , 2006
Marinomycine A	<i>Marinispora</i> sp.	Antitumorale	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Actinopolysporines A et B	<i>Actinopolyspora erythrae</i>	Anticancéreuse	Zhao <i>et al.</i> , 2011
Aminosamide D	<i>Streptomyces variabilis</i>	Cytotoxique	Pan <i>et al.</i> , 2012

## 2. Production d'enzymes

Les enzymes des microorganismes halophiles sont actives et stables à haute teneur en sel et peuvent être utilisées dans des procédés industriels difficiles telles que la transformation des aliments, les processus biosynthétiques, etc. (Ventosa *et al.*, 2005). Les « protéines halophiles » concurrencent efficacement avec les sels pour l'hydratation, une propriété qui peut entraîner une résistance à des conditions de faible activité de l'eau (Kerkar 2004). Certaines enzymes d'actinobactéries, telles que la pronase de *Streptomyces griseus* et la kérase de *Streptomyces fradiae*, sont utilisées pour la production commerciale de produits biotechnologiques tels que les hydrolysats de protéines à partir de différentes sources protéiques (Hiramatsu et Ouchi, 1963). Les protéases des *Streptomyces* présentent comme avantage l'élimination facile du mycélium par un procédé de filtration ou centrifugation simple (Phadatare *et al.*, 1993). *Nesterenkonia halobia* produit une amylase qui, en absence de concentrations élevées de NaCl ou KCl, perd son activité (Onishi et Kamekura, 1972). La polyhydroxybutyrate (PHB) polymérase a été rapportée chez *Nocardiopsis aegyptia*. Cette actinobactérie halophile est en mesure d'utiliser le PHB et ses copolymères comme unique source de carbone (Ghanem *et al.*, 2005). Une activité kératinase a été détectée chez *Nocardiopsis halotolerans* et *Saccharomonospora halophila* (Al-Zarban *et al.*, 2002c). Ces enzymes extracellulaires sont également sécrétées à des concentrations élevées de sel. Un large éventail d'activités enzymatiques (Zhang et Kim, 2010) et d'enzymes comme la L-glutaminase

(Sivakumar *et al.*, 2006), l' $\alpha$ -galactosidase (Anisha et Prema, 2006), l' $\alpha$ -amylase (Kundu *et al.*, 2006), la cellulase (Murugan *et al.*, 2007), la protéase (Sahu *et al.*, 2007a) et la L-asparaginase (Sahu *et al.*, 2007b) a également été signalé chez les actinobactéries marines.

### 3. Synthèse des solutés compatibles

Les solutés compatibles agissent comme protecteurs de stress et peuvent stabiliser les biomacromolécules contre les environnements difficiles tels que la température élevée, la dessiccation et la congélation (Nieto et Vargas 2002). Habituellement, les acides aminés et les polyols, par exemple, la glycine bêtaïne, l'ectoïne, le saccharose, le tréhalose et le glycérol, sont accumulés chez les halophiles comme solutés compatibles. Ces molécules, en particulier la glycine bêtaïne et l'ectoïne, ont une importance considérable en biotechnologie (Ventosa *et al.*, 1998).

### 4. Production de composés détoxifiants

Beaucoup de formations géologiques naturelles, telles que les réserves de pétrole, sont associées à des saumures hypersalines. Les environnements salins se répandent à la suite de l'irrigation et d'autres utilisations de l'eau douce et aussi de nombreux procédés industriels. Les microorganismes halophiles sont utiles pour la biorestauration des saumures hypersalines contaminées (DasSarma et Arora, 2001) où les non-halotolérants montrent une efficacité médiocre de dégradation due à la forte salinité. Senthilkumar *et al.* (2005) ont isolé une souche d'*Actinopolyspora* sp. d'un marais salant qui a montré une plus grande résistance à l'égard du chlorure mercurique. La dégradation de composés aliphatiques et aromatiques dans des conditions de forte salinité par une actinobactérie extrêmement halophile a aussi été rapportée (Al-Mueini *et al.*, 2007). Une nouvelle espèce extrêmement halophile d'*Actinopolyspora* a été isolée à partir d'un environnement d'un champ de pétrole salin et aride. La souche se développe bien à des concentrations en sel allant jusqu'à 25% et est tolérante à de fortes concentrations d'hydrocarbures aromatiques et aliphatiques (Al-Mueini *et al.*, 2007). Une souche de *Rhodococcus* sp. isolée à partir d'une région côtière polluée par de l'huile s'est révélée capable de dégrader des composés aliphatiques et aromatiques (Sharma et Pant 2001). Les espèces halophiles et halotolérantes facultatives peuvent également être importantes dans la biodégradation des sols et des systèmes aquatiques contaminés par les hydrocarbures.

## 5. Autres applications potentielles

D'autres biomolécules sécrétées par les actinobactéries halophiles se sont révélées prometteuses pour les applications biotechnologiques. Ces molécules sont des polymères, des protéines d'origine unicellulaire (POU), des inhibiteurs d'enzymes, de nouveaux médicaments, etc. Les inhibiteurs enzymatiques ont reçu une attention croissante dans l'étude des structures enzymatiques, des mécanismes de réaction et en pharmacologie. Différents types d'inhibiteurs d'enzymes, à savoir, l' $\alpha$ -glucosidase, la N-acétyl- $\alpha$ -D-glucosaminidase, la pyroglutamyl peptidase ou l' $\alpha$ -amylase sont signalés chez les actinobactéries marines (Imada 2005). Les actinobactéries sont connues pour améliorer la croissance juvénile des poissons, et peuvent ainsi être considérés comme des POU (Manju et Dhevendaran, 1997) ou utilisées comme colorants alimentaires. Parmi les pigments isolés à partir des actinobactéries halophiles, les caroténoïdes de couleur jaune-rouge sont produites par l'actinobactérie halophile *Nesterenkonia halobia* (DasSarma et Arora, 2001).

## IV. PROPRIETES ANTAGONISTES ET ANTIBIOTIQUES DES ACTINOBACTERIES

Pour pallier aux problèmes de la résistance microbienne aux antibiotiques actuels et des risques d'épidémies, les chercheurs s'évertuent à essayer de trouver des nouvelles molécules efficaces, qui agissent différemment et qui ne sont donc pas sensibles aux mécanismes de résistance existants. En effet, les molécules en essai clinique aujourd'hui sont pour la plupart des dérivés des classes chimiques pour lesquelles il y a déjà des mécanismes de résistance. Or, bien que cette méthode soit historiquement la méthode de choix, les modifications structurales apportées à la molécule ne changent pas de façon significative ses interactions avec sa cible (Payne *et al.*, 2007).

### 1. Recherche de nouvelles molécules bioactives

Les molécules naturelles ont toujours constitué la principale source d'antibiotiques depuis le début de leur utilisation et la première idée qui vient à l'esprit lorsque le sujet « découverte d'un nouvel antibiotique » est abordé, est la découverte d'un microorganisme inconnu produisant une molécule inconnue à forte activité antimicrobienne. Pourtant, la recherche de nouvelles molécules naturelles a connu un certain déclin au cours des deux dernières décennies au profit de molécules synthétiques avant de montrer un regain d'intérêt. Le retour aux produits naturels est dû à leur

incroyable diversité structurale, à leurs propriétés biochimiques, ainsi qu'à d'autres propriétés moléculaires que ne présentent pas les antibiotiques synthétiques (Koehn et Carter, 2005).

## 1.1. Méthodes classiques

Les programmes classiques de screening des antibiotiques impliquent l'isolement et la culture du microorganisme, l'évaluation de son activité antibiotique et la caractérisation et l'identification des molécules actives (Goodfellow *et al.*, 1988).

### 1.1.1. Isolement des actinobactéries et conditions de culture

Le réservoir des molécules naturelles paraît inépuisable lorsqu'on considère que l'on ne connaît qu'une faible proportion des bactéries vivant sur terre ce qui laisse place à la découverte d'une multitude de nouveaux taxons, mais aussi de nouvelles molécules bioactives. Les raisons de la non-découverte de ces bactéries peut être dû au fait que leur culture soit assez difficile, ou encore que leurs niches écologiques soient très particulières, comme par exemple les milieux extrêmes (volcans, lacs salés, déserts chauds ou froids, etc.). Ainsi pour ces deux raisons, les chercheurs pensent que ces souches microbiennes encore inconnues doivent posséder des métabolismes particuliers et différents et donc la capacité de produire de nouvelles molécules. Dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les chercheurs ont commencé à s'intéresser ces dernières années à des genres rares provenant de milieux extrêmes (Sabaou *et al.*, 1998; Lazzarini *et al.*, 2000; Barakate *et al.*, 2002; Donadio *et al.*, 2002; Moncheva *et al.*, 2002; Naidenova et Vladimirova, 2002; Bouras *et al.*, 2008). Ainsi, de nombreuses campagnes sont menées à travers le monde pour découvrir de nouveaux microorganismes. L'obtention de ces actinobactéries rares ou peu fréquentes est possible grâce à l'isolement sélectif par le prétraitement des sols à la chaleur (Nonomura et Ohara, 1969, 1971), l'addition d'agents chimiques dans les milieux d'isolement tels que les antibiotiques et le benzoate et la recherche des actinobactéries dans des habitats inhabituels (Nolan et Cross, 1988; Sabaou *et al.*, 1998). La variation de la composition des milieux de production des antibiotiques est un élément clé pour l'obtention des molécules actives. Plusieurs travaux ont signalé l'effet des sources de carbone et d'azote sur la biosynthèse des antibiotiques (Iwai et Omura, 1989; Bouras, 2005), ainsi que les besoins en sels minéraux (Hermans *et al.*, 1989). Certains composés favorisent la production d'un type d'antibiotique comme l'amidon et la farine de soja qui incitent la production des antibiotiques aminoglycosidiques. Les conditions de culture comme la température et l'agitation jouent aussi un rôle important dans la production des antibiotiques (Okami et Hotta, 1988).



### **1.1.2. Choix des microorganismes-cibles**

La mise en évidence de l'activité antibiotique d'une actinobactérie est réalisée sur des milieux de culture solides par les méthodes des stries croisées, des cylindres d'agar ou de la double couche, contre une série de microorganismes-cibles (champignons, bactéries et levures). Certains chercheurs ont développé des screening ciblés par l'utilisation des bactéries résistantes à certains types d'antibiotiques; ex: utilisation de souches résistantes aux aminoglycosides pour la sélection des actinobactéries productrices d'antibiotiques aminoglycosidiques (Okami et Hotta, 1988).

### **1.1.3. Production et caractérisation des antibiotiques**

La production d'antibiotiques est réalisée dans les conditions optimales de synthèse en milieu de culture, température et durée d'incubation, pH et aération. Les molécules actives produites par les actinobactéries sont récupérées par extraction à partir de la biomasse ou plus souvent du filtrat de culture en utilisant des solvants qui permettent une bonne extraction sans altération des métabolites. Les métabolites obtenus sont séparés par différentes méthodes de purification telles que la chromatographie sur couche mince, la chromatographie d'exclusion sur gel (séphadex, polyacrylamide ou agarose etc.) et l'HPLC comme dernière étape de purification. La caractérisation des antibiotiques purifiés repose sur les différentes analyses spectroscopiques: UV-visible, infrarouge, masse et résonance magnétique nucléaire (RMN).

## **1.2. Méthodes actuelles**

Des méthodes de criblage génétique sont développées pour révéler la capacité réelle des actinobactéries à produire des molécules bioactives et par conséquent la découverte de molécules originales (Gontang *et al.*, 2010). Elles consistent à développer de nouvelles molécules, soit par « design » moléculaire à partir des cibles moléculaires bactériennes (Singh *et al.*, 2007), soit par modifications chimiques de molécules existantes ou alors par muta-synthèse, c'est-à-dire en fournissant à la bactérie des intermédiaires métaboliques différents (Juguet *et al.*, 2008). Par ailleurs, il est à noter que beaucoup d'études se concentrent sur l'amélioration des rendements de production des molécules déjà existantes. La technique utilisée est l'ingénierie métabolique (Olano *et al.*, 2008). Elle consiste soit à rediriger les flux des précurseurs métaboliques vers la production de la molécule d'intérêt, soit à déréguler certaines voies métaboliques ou encore à surexprimer les enzymes impliquées dans les étapes-clés de ces voies. Les actinobactéries sont une source prolifique de produits naturels bioactifs y compris les polycétones, les peptides "non ribosomaux" et leur

combinaison. Ces produits peuvent avoir plusieurs actions: antibiotique, antitumorale, immunosuppressive, etc. Le screening des gènes polyketide synthases (PKS) et “nonribosomal peptide synthetases” (NRPS) fait partie des programmes actuels de recherche de nouvelles molécules bioactives.

## 2. Les antibiotiques produits par les actinobactéries

Les actinobactéries sont considérées comme étant les microorganismes les plus grands producteurs de composés bioactifs tels que les antiviraux, les antiparasitaires, les immunostimulants, les immunosuppresseurs, les enzymes, les vitamines, etc. ). En effet, plus de 45% des molécules bioactives d'origine microbienne (soit environ 10 000 molécules) sont produits par ces microorganismes (Solecka *et al.*, 2012). Cependant, ces bactéries sont surtout réputées pour la production d'antibiotiques (Takahashi et Omura, 2003; Solanki et kahana *et al.*, 2008. Parmi les antibiotiques sécrétées par les actinobactéries mycéliennes, environ 75% (soit, plus de 7600 molécules) sont produits par les espèces du genre *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Bull et Stach, 2005). Les autres genres (dont certains sont relativement rares) tels que *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, etc., sécrètent aussi de nombreux antibiotiques (plus de 2500) dont plusieurs sont importants sur le plan thérapeutique (Sarkar *et al.*, 2008; Genilloud *et al.*, 2010).

Selon Berdy *et al.* (1987) et Berdy (2005), les antibiotiques sécrétés par les actinobactéries peuvent être appartenir aux familles et sous-familles suivantes: glucides et apparentés (glucides purs, aminoglycosides, glycolipides, etc.), lactones macrocyclines (macrolides, polyènes, macrolactames, etc.), quinones et apparentés (tétracyclines, benzoquinones, anthraquinone, anthracyclines, etc.), peptides et dérivés (homopeptides, hétéropeptides, peptolides, etc.), hétérocycles à azote et hétérocycles à oxygène, composés alicycliques (terpènes, oligoterpènes, etc.), aromatiques (composés benzéniques ou non) et aliphatiques (dérivés des alcanes, dérivés des acides carboxyliques, composés contenant du soufre, du phosphore, etc.).

Les antibiotiques sécrétés par les actinobactéries peuvent être à activité antibactériennes et/ou antifongiques (aminoglycosides, aromatiques, glycopeptides, macrolides, polyènes, tétracyclines, etc.), ou encore, avoir des propriétés antitumorales et cytostatiques (adriamycine, anthramycine, daunomycine, rebeccamycine, etc.) (Mann, 2001). Plusieurs d'entre eux ont trouvé une application thérapeutique assez importante. Ces antibiotiques peuvent agir à différents niveaux de la cellule (paroi, membrane plasmique, ribosomes, ADN, ARN, etc.).

Les antibiotiques sécrétés par les actinobactéries halophiles sont en nombre relativement réduit comme nous l'avons souligné précédemment, mais ces dernières années, les chercheurs s'intéressent de plus en plus à ce type de microorganismes dans l'espoir de découvrir de nouvelles molécules intéressantes.

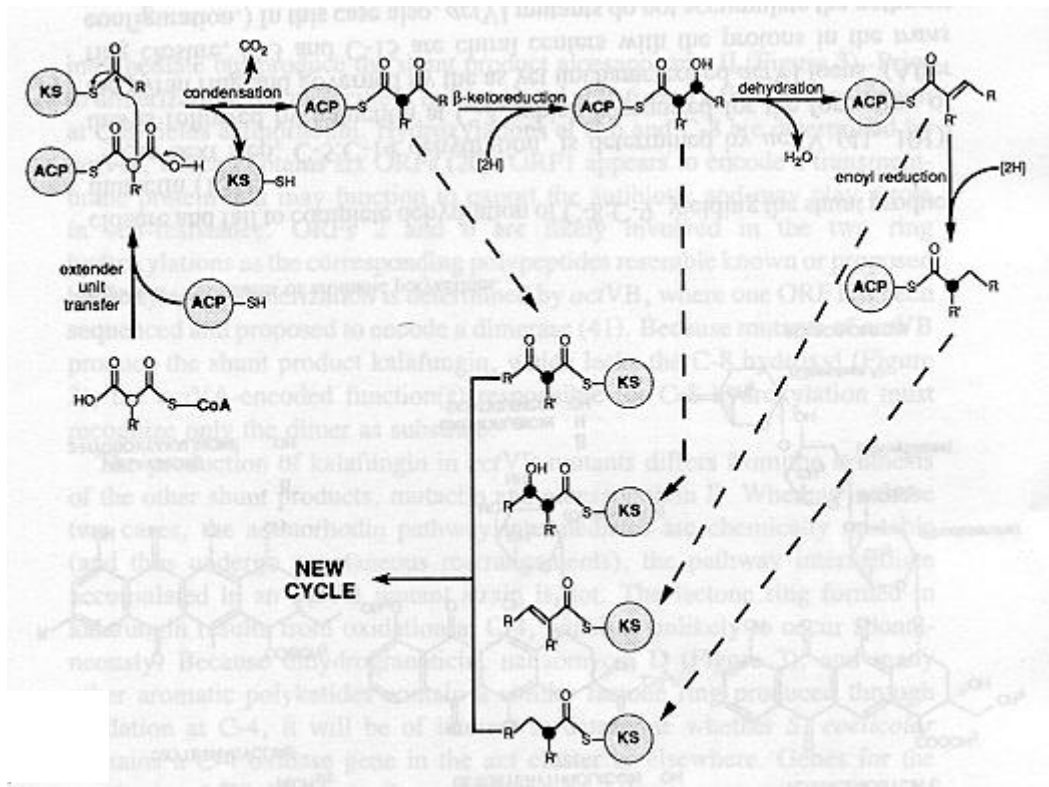
### **3. Les polycétones (polykétides) et les “ Non-Ribosomal Peptide Synthetases”**

#### **3.1. Les polycétones (polykétides)**

Les polycétones ou « polykétides » constituent une classe de produits naturels qui sont produits par des bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Les polycétones naturelles et les produits dérivés jouent un rôle important dans la médecine humaine et vétérinaire. Par exemple, plusieurs médicaments pour le traitement des cancers (daunorubicine et enediyne neocarzinostatine) appartiennent à cette classe de produits naturels. L'étude de ces composés peut éventuellement conduire au développement de médicaments à succès. En raison de leur importance et de la diversité des structures chimiques, la recherche sur les polycétones et leur biosynthèse a été lancée depuis plus d'un siècle. Le développement de marqueur isotopique, RMN et, plus récemment, l'avènement de la biologie moléculaire ont tous fourni de nouvelles perspectives dans la chimie et l'enzymologie de la biosynthèse des polykétides. Bien que les structures des polycétones soient diverses, celles-ci sont biosynthétisées par le même mécanisme. Le terme de polycétone a été introduit pour désigner ces composés dont la structure chimique possède une chaîne d'alternance de groupes cétone ( $>C=O$ ) et de groupes méthylène ( $-CH_2-$ ). Les polycétones dérivent de la condensation successive de petits acides carboxyliques dans un processus analogue à celui de la biosynthèse des acides gras. La formation de la chaîne de carbone de la polycétone est le résultat de la condensation tout d'abord d'un acetyl-CoA (une unité acétate) et d'un malonyl-CoA (une unité malonate), puis de la prolongation par condensation successive des groupements acyles. Cette condensation est catalysée par un enzyme appelé polycétone synthase (PKS). Ce squelette subit plusieurs modifications telles que la cyclisation, la réduction et la méthylation, ce qui donne une famille de polycétones très diversifiées dans leurs structures.

Les polycétones synthases ou PKS peuvent posséder l'un et/ou l'autre des domaines enzymatiques suivants: ketosynthase (KS), acyl transférase (AT), ketoreductase (KR), enoyle reductase (ER), méthyltransférase (MT), acyle carrier protein (ACP), thioestérase (TE) et déshydratase (DH). Cependant AT, KS, ACP sont les trois domaines principaux tandis que les autres sont optionnels. Le domaine ketosynthase (KS) est le domaine le plus conservé. Il catalyse la

réaction de condensation. Le domaine AT transfère des composants de précurseurs acyl-CoA à l'ACP qui maintient la chaîne de la polycétone en condensation et prépare les précurseurs transportés par AT pour la condensation suivante. Le domaine KR réduit le groupe  $\beta$ -cétone en fonction alcoolique. Le domaine DH élimine l'eau de la fonction alcoolique pour former un thioester insaturé. Le domaine ER catalyse la dernière réduction du groupe enoyle en groupe alcyle. Le domaine MT catalyse l'addition d'un groupe méthyle. En dernier, le domaine TE catalyse la cyclisation ou déplace le produit final du complexe PKS une fois que la biosynthèse se termine.



**Figure 4.** Synthèse d'une polycétone (Katz et Donodio, 1993).

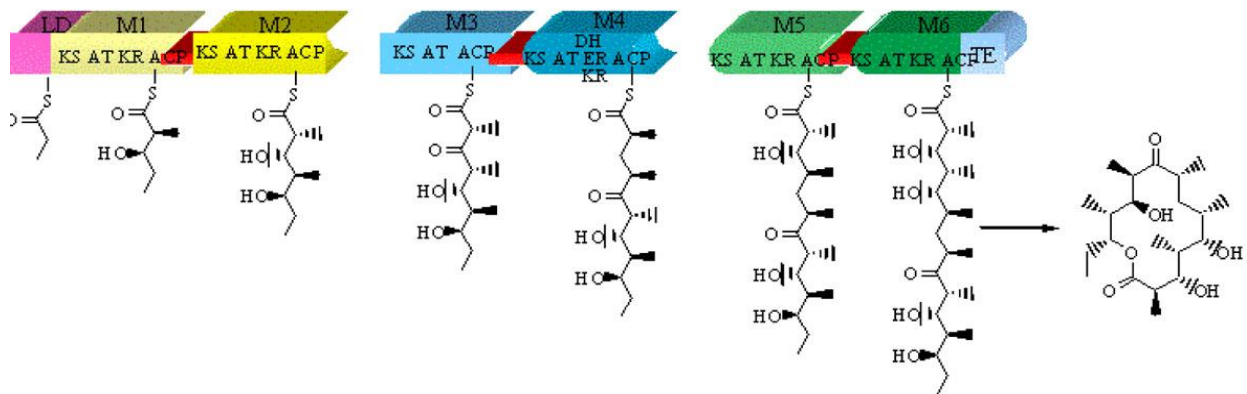
### 3.1.1. Différents types de PKS

La biosynthèse des polycétone est généralement réalisée par un ensemble d'enzymes travaillant en coopération; chaque ensemble d'enzymes impliqué dans la production d'une polycétone naturelle est appelé polycétone synthase (PKS). Les PKS sont classées dans trois types en fonction de leur organisation génique:

- PKS de type I: ce sont des protéines multidomaines (contenant plusieurs domaines enzymatiques sur un même polypeptide) qui peuvent être soit modulaire (Figure 5), comme par exemple les systèmes modulaires responsables de la synthèse des macrolides (érythromycine,

rapamycine, rifamycine B, etc.) chez les bactéries, soit itérative (Figure 6) (par exemple la lovastatine nonaketide).

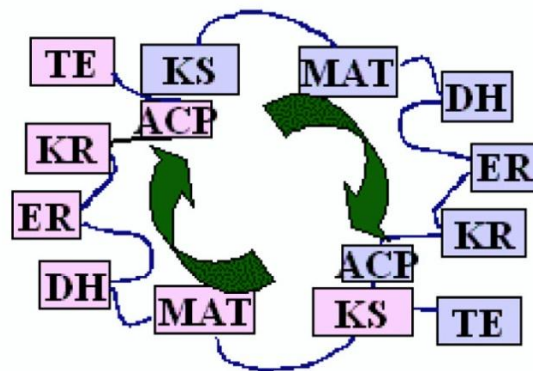
- PKS modulaires: elles regroupent des sites actifs, appelé modules, polypeptides utilisés pour synthétiser les chaîne de carbone. Les sites actifs de chaque module sont utilisés une seule fois durant l'assemblage de la molécule et déterminent le choix des unités de structure et le niveau de réduction ou de déshydratation pour le cycle d'extension qu'ils catalysent. La longueur de la chaîne de carbone et le nombre de cycles de réaction sont déterminés par le nombre et l'ordre des modules dans les polypeptides constituant la PKS (McDaniel et al., 1999).



**Figure 5.** Structure d'une PKS de type I modulaire (Bacha, 2009).

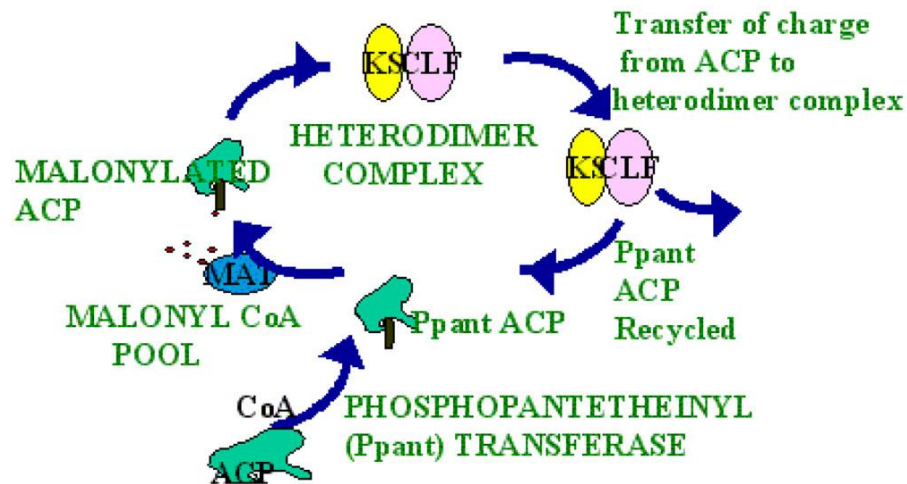
**Note:** KS: ketosynthase; AT: acyl transferase; KR: ketoreductase; ACP: acyl carrier protein; TE: thioesterase; DH: déshydratase.

- PKS itératives: elles utilisent d'une façon répétitive leurs sites actifs durant la construction de la chaîne de carbone à partir des unités acétates et malonates.



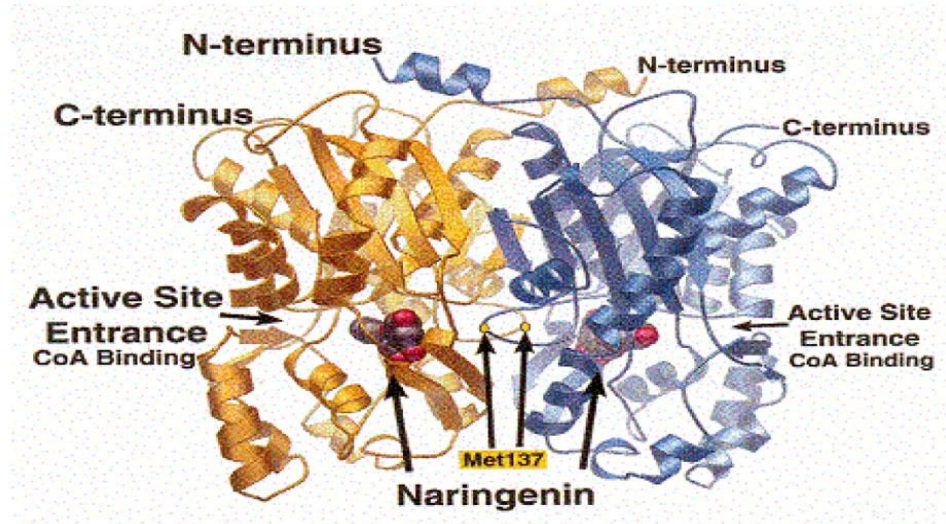
**Figure 6.** Structure d'une PKS de type I itérative (Bacha, 2009).

- PKS de type II: ce sont des complexes de protéines monofonctionnelles (exemple: actinorhodine de *Streptomyces coelicolor*). Ces PKS catalysent la formation des composés qui nécessitent des étapes d'aromaturation et de cyclisation mais pas de cycles de réduction ou de déshydratation. Ces PKS sont impliquées dans la biosynthèse des produits bactériens aromatiques naturels tels que l'actinorhodine, la tétracénomycine et la doxorubicine (Davis et Chater, 1990). Un modèle hypothétique de ce système est présenté sur la Figure 7.



**Figure 7.** Actinorhodine synthase, PKS de type II (Bacha, 2009).

- PKS de type III (Figure 8): elles ont un site actif unique pour catalyser l'extension de la chaîne de polykétide et une cyclisation sans l'utilisation d'une ACP. Elles sont responsables de la synthèse des chalcones et des stilbènes chez les plantes, ainsi que des phénols polyhydroxylés chez les bactéries. Les chalcone synthases sont de petites protéines avec une chaîne polypeptidique unique, et sont impliquées dans la biosynthèse des précurseurs des flavonoïdes (Austin et Noel, 2003; Weissman, 2009).



**Figure 8.** PKS de type III (Khosla *et al.*, 1999).

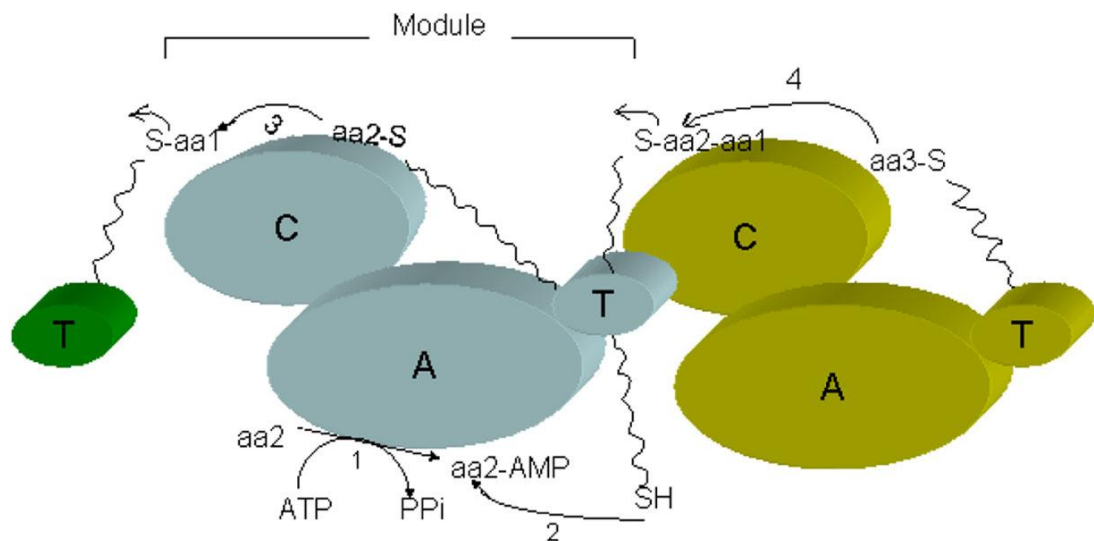
### 3.2. Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS)

Les “peptides non ribosomiques” sont des peptides qui ne sont pas synthétisés au niveau des ribosomes. L’une des particularités des peptides non ribosomiques est leur petite taille. Ces peptides ne sont pas codés par un gène, et ils ne sont pas limités aux vingt acides aminés de base. En effet la particularité du système NRPS est la capacité de synthétiser des peptides contenant des acides aminés protéinogènes et non protéinogènes. Dans de nombreux cas, ces enzymes fonctionnent en collaboration avec les polycétone synthases donnant des produits hybrides. Les produits de ces enzymes multifonctionnelles ont un large spectre d’activités biologiques, et certains d’entre eux ont été utiles pour la médecine, l’agriculture et la recherche biologique (Smith *et al.*, 1990; Kleinkauf et Doehren, 1996; Schwarzer et Marahiel, 2001).

Les NRPS sont organisées de façon modulaire. Chaque module est responsable de l’incorporation d’un monomère spécifique. Les modules sont subdivisés en domaines, et chaque domaine catalyse une réaction spécifique dans l’incorporation d’un monomère. Le nombre et l’ordre des modules et le type de domaines présents dans les modules de chaque NRPS détermine la variation structurale des peptides synthétisés et cela par la dictée du nombre, de l’ordre et du choix des acides aminés à incorporer lors de l’élargissement. Quatre domaines principaux sont nécessaires pour une synthèse complète (Figure 9).

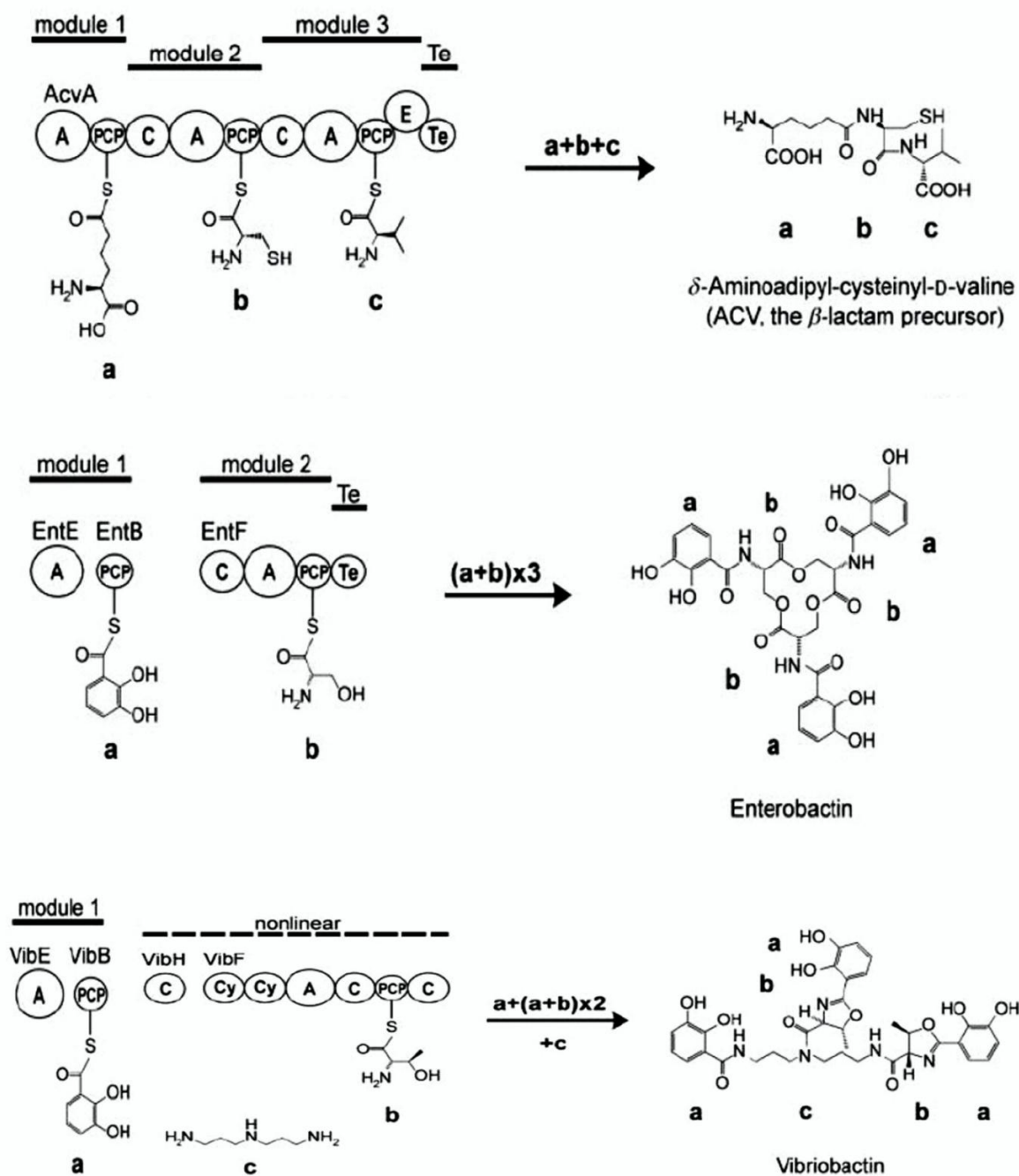
Chaque domaine a une fonction spécifique lors de l’incorporation du monomère. Le domaine A, de 500 à 600 résidus d’acides aminés, est nécessaire pour la reconnaissance de l’acide aminé et son

activation. Les 80 à 100 résidus d'acides aminés du domaine T, situé en aval du domaine A, forme une liaison thioester (liaison covalente) entre le monomère activé et la NRPS et cela permet au peptide en cours de synthèse de rester fixé à la NRPS tout au long du processus d'élongation. Le domaine de condensation C (450 acides aminés) se trouve généralement après chaque module A-T et catalyse la formation de liaisons peptidiques entre les résidus liés sur deux modules adjacents. En règle générale, le nombre et l'ordre des modules présent dans une NRPS déterminent la longueur et la structure du peptide non ribosomique qui en résulte. Le domaine thioestérase, présent uniquement dans le dernier module, libère le peptide de la NRPS. En plus des domaines A, T et C, le domaine N-méthyl-transferase (MT) méthyle l'acide aminé spécifique du domaine A et l'insère entre les domaines A et T d'un module donné. Le domaine d'épimérase (E) transforme un acide aminé de la forme L vers la D et l'insère entre les domaines T et C. Il existe trois grands types de biosynthèse des peptides à travers l'implication des NRPS. Le premier est la biosynthèse linéaire (Figure 10). Dans ce type de biosynthèse, il y a une colinéarité entre la synthétase et le peptide produit. Cela signifie que les séquences modulaires correspondent à celles des monomères incorporés dans le produit. Ce type de biosynthèse est le plus fréquent. Le deuxième type est la biosynthèse itérative (Figure 10). Dans ce cas, certains modules de la synthétase sont utilisés plus d'une fois au cours de la synthèse d'un peptide. Le dernier type est la biosynthèse non linéaire (Figure 10). Dans ce type de biosynthèse, l'agencement des modules de la synthétase est différent de celui du peptide (Meklat A. 2012).



**Figure 9.** Minimum de domaines requis dans une NRPS (Bacha, 2009).





**Figure 10.** Les trois types de biosynthèse:

- Biosynthèse linéaire: synthèse du tripeptide ACV, précurseur de la pénicilline et de la céphalosporine.
- Biosynthèse itérative: synthèse de l'entérobactine composée d'un dipeptide répété trois fois.
- Biosynthèse non linéaire: synthèse de la vibriobactine, peptide mixte NRPS/PKS (Mootz *et al.*, 2002).

## **MATERIEL ET METHODES**

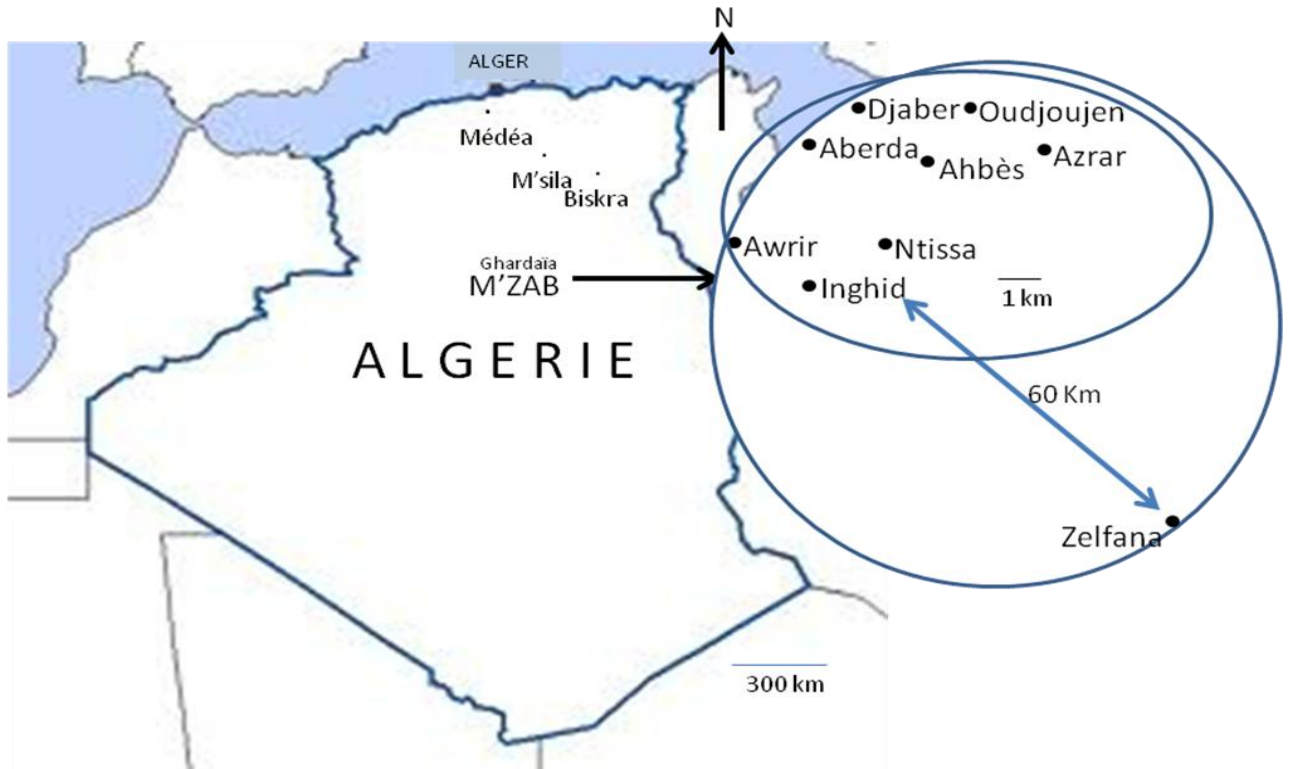
## I. SITES D'ETUDES ET ECHANTILLONS DE SOLS

### 1. Site d'étude

Les actinobactéries halophiles et halotolérantes sont recherchées dans des sols provenant des régions du M'zab, de Biskra, de Médéa et de M'Sila. Au total, vingt quatre échantillons de sol ont été prélevés:

- Région du M'zab: 18 échantillons de sols provenant des communes de Ahbès (échantillons: AH1, AH2 et PAL3), d'Aberda (AB1 et AB2), d'Inghid (PAL2), d'Azrar (AZ1 et AZ2), d'Awrir (AW), d'Oudjoujen (PAL1 et A1), de Ntissa (ALL1 et ALL2), de Djaber (DJ), et de Zelfana (ZF1, ZF2, ZF4 et ZF5).
- Région de Biskra: 3 échantillons provenant des communes de Sidi Khaled (SK1 et SK2) et de Lioua (LIO).
- Région de Médéa: 2 échantillons provenant de la commune de Bougezoul (BG1 et BG2).
- Région de M'sila : un échantillon provenant de Oued El Maleh (OMA), commune de Magra.

La localisation géographique des sols prélevés est indiquée dans la Figure 11.



**Figure 11.** Lieux de prélèvements des échantillons de sols.

## 2. Echantillons de sols

### 2.1. Prélèvements

Les prélèvements des 24 échantillons de sols ont été effectués aseptiquement en surface après avoir enlevé les 3 premiers centimètres. Les sols sont placés dans des sacs stériles et ont été conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

### 2.2. Caractéristiques pédologiques

Les analyses physico-chimiques des sols ont été effectuées par l'Institut National de Recherche Agronomique (I.N.R.A, Alger).

Ces analyses ont montré que les sols sont alcalins (pH: 7,8 à 8,9) à l'exception des échantillons provenant d'Ahbès (AHS1, AHS2, PAL3) qui ont un pH voisins de la neutralité (7,2).

La texture des sols est sableuse, sablo-limoneuse à limono-sableuse pour les sols des régions du M'zab et de Biskra, et limoneuse à limono-argileuse pour les sols des régions de M'sila et de Médéa.

La teneur en carbone des sols est assez faible (0,2 à 1,2%), la plus haute valeur étant obtenue dans l'échantillon BG1 de Boughezoul (Médéa) (1,2%). L'azote est présent en très petites quantités dans tous les sols (0,04 à 0,07%).

Les échantillons de sol des régions du M'zab et de Biskra sont modérément salés (conductivité électrique ou CE au 1/5 variant de 2,5 à 4,2 mS/cm), à l'exception de sols de la commune de Zelfana qui sont très salés (CE comprise entre 15,2 à 18,1 mS/cm). Ceux des régions de M'sila et de Médéa (Boughezoul) sont salés (CE comprise entre 7,5 et 11,7 mS/cm)

## II. ISOLEMENT, DENOMBREMENT, PURIFICATION ET CONSERVATION DES SOUCHES

### 1. Milieux d'isolement

Les milieux utilisés pour l'isolement des actinobactéries sont le milieu chitine-vitamines B agar (CHV) préconisé par Hayakawa et Nonomura (1984) et le milieu CMA (« complex medium agar ») (Chun *et al.*, 2000), à pH 7,2, contenant chacun 15% et 20% de NaCl et 50 mg/l de cycloheximide ou actidione pour empêcher la croissance des champignons halophiles. La composition des milieux est donnée en annexe. Le choix du milieu CHV est basé sur les résultats déjà obtenus dans notre

laboratoire et qui ont montré que ce milieu est le meilleur parmi plusieurs autres testés du point de vue quantitatif (augmentation du nombre d'actinobactéries isolées) et qualitatif (diversité plus élevée des espèces). Par contre, le milieu CMA, même s'il n'est pas connu comme étant un milieu d'isolement pour les actinobactéries, il constitue un milieu riche en éléments organiques et en sels divers qui sont favorables à la croissance des actinobactéries halophiles.

## **2. Technique d'ensemencement et conditions d'incubation**

Les ensemencements sont effectués par la méthode de suspensions-dilutions. Un gramme de sol est suspendu dans 10 ml d'eau distillée stérile. Après agitation vigoureuse (10 min) à l'aide d'un vortex, la suspension-mère ainsi obtenue est diluée de 10 en 10 dans de l'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-5}$ . Par la suite, 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur les milieux CHV et CMA (additionnés chacun de 15 et 20% de NaCl) précédemment stérilisés et coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre. Trois répétitions sont effectuées pour chacune des dilutions. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 30 jours.

## **3. Dénombrement et sélection des actinobactéries**

Après incubation, les boîtes de Pétri ensemencées sont examinées chaque semaine à l'œil nu et au microscope optique (grossissement x10 et x40) afin de visualiser les colonies d'actinobactéries qui apparaissent à la surface des milieux. Les colonies qui présentent les caractéristiques morphologiques des actinobactéries mycéliennes (présence de mycélium du substrat et très souvent aussi du mycélium aérien) sont comptées par boîte et par dilution (3 répétitions par dilution). La moyenne du nombre de colonies est calculée de façon à obtenir le nombre de CFU (colonie formant unité) par gramme de sol sec et ce, pour chaque milieu d'isolement. Les colonies, surtout celles qui présentent des caractéristiques morphologiques différentes (appartenant probablement à différents genres et/ou espèces), sont sélectionnées. Elles sont au nombre de 91.

## **4. Purification et conservation**

Les colonies, prélevées à l'aide d'une pointe fine et stérile, sont déposées sur le milieu CMA, (contenant 15% de NaCl) puis purifiées par stries. Les souches pures sont numérotées puis repiquées

sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis. L'incubation a lieu à 30°C pendant 15 à 21 jours. Les souches sont ensuite conservées à 4°C dans une chambre froide.

### **III. ETUDE TAXONOMIQUE DES ACTINOBACTERIES HALOPHILES**

#### **1. Etude morphologique**

L'étude des caractéristiques culturelles (croissance, couleur des mycélia aérien et du substrat, ainsi que celle des pigments diffusibles) et micromorphologiques (sporulation, agencement des spores, fragmentation ou non des mycélia) des isolats d'actinobactéries sélectionnés a été effectuée sur les milieux préconisés lors de l'International *Streptomyces* Project (ou ISP) et qui sont, l'ISP2, et l'ISP4 (Shirling et Gottlieb, 1966), ainsi que sur les milieux CMA et gélose nutritive (GN) (Waksman, 1961) (composition donnée en annexe).

##### **1.1. Étude macromorphologique**

Cette étude consiste à noter aux 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours d'incubation à 30°C, la croissance de la souche, l'aspect et la couleur des mycélia aérien et du substrat, ainsi que la production et la couleur des pigments diffusibles dans les milieux (s'ils sont sécrétés). Les couleurs des mycélia aérien et du substrat sont définis à l'aide de la charte de couleurs (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC -NBS) de Kelly et Judd (1976).

##### **1.2. Etude micromorphologique**

Cette étude est essentielle pour la reconnaissance des genres. Elle est réalisée à l'aide d'un microscope optique (Motic, série B1) pour toutes les souches. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri (aux grossissements x10 et x40) et ce, pour étudier les structures en place sans les altérer (mycélia et fructification). Elles consistent à observer la sporulation du mycélium aérien, la fragmentation ou non du mycélium du substrat, etc.

Un isolat, qui s'est avéré être un nouveau genre, a fait l'objet d'une observation au microscope électronique à balayage. Des échantillons (disques de 0,5 cm de diamètre) sont découpés à partir des cultures solides ayant poussé pendant deux semaines à 30°C sur le milieu ISP2 contenant 15% de NaCl. Les échantillons sont fixés après incubation (pendant 4 h à 4°C) dans un bain d'une solution de fixation composée de deux volumes de glutaraldéhyde à 4%, d'un volume de tampon cacodylate à 0,4

M (pH 7,4) et d'un volume d'eau distillée. Après fixation, les échantillons sont lavés trois fois dans des bains d'eau distillée pendant 10 min chacun, puis déshydratés dans des bains d'alcool éthylique à concentration croissante (50, 70, 80, 90 et 100%) pendant 10 min pour les 4 premiers bains et trois fois 15 min pour le dernier bain. Les échantillons subissent ensuite une dessiccation par incubation dans un bain d'hexaméthylsilazane pur pendant 3 min, avant d'être montés sur des plots en aluminium pour subir une métallisation à l'or et au palladium par évaporation cathodique (1,2 volt, 10 mA, 100 Å. min<sup>-1</sup>) pendant 3 à 4 min (Meklat A. 2012).

## 2. Etude chimique des constituants cellulaires

En plus des études morphologiques, une étude chimiotaxonomique est nécessaire pour la détermination des genres d'actinobactéries. Cette étude consiste à déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique ou DAP (forme LL ou DL = *meso*) et la présence ou non de glycine au niveau des parois, ainsi que la composition cellulaire en sucres, en phospholipides, en acides gras et en ménaquinones.

### 2.1. Obtention de la biomasse

Des cultures liquides en agitation rotative (250 rpm) sont lancées dans un shaker à 30°C pendant 5 à 8 jours (selon la vitesse de croissance des souches sélectionnées), sur le milieu liquide CM (CMA sans agar) contenant 15% de NaCl. A la fin de l'incubation, et pour chaque souche, la biomasse est recueillie par centrifugation à 4000 g. Elle est lavée plusieurs fois à l'eau distillée (3 à 4 fois) jusqu'à l'élimination complète du milieu de culture, puis rincée rapidement avec de l'éthanol à 70% (pour faciliter le séchage), avant d'être séchée à 40°C pendant une nuit. La biomasse sèche ainsi obtenue est conservée au congélateur à -20°C en attendant d'effectuer les différentes analyses.

### 2.2. Détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et mise en évidence de la glycine

Cette analyse consiste à déterminer la forme isomérique (LL ou DL) de l'acide diaminopimélique (DAP) et la mise en évidence de la glycine. La méthode utilisée est celle de Becker *et al.* (1964). Elle consiste à rechercher ces acides aminés pariétaux après une hydrolyse cellulaire assez forte à l'acide chlorhydrique. Les étapes réalisées sont les suivantes:

- 10 mg de mycélium sec de chaque isolat d'actinobactérie sont hydrolysés pendant 18 h à 100°C, par 1 ml d'acide chlorhydrique 6 N dans des tubes à vis hermétiquement fermés.

- Les hydrolysats sont ensuite filtrés sur membrane en verre pour éliminer les débris mycéliens, puis évaporés à sec dans un bain de sable chaud.
- Chaque résidu est lavé 3 à 4 fois à l'eau distillée (3 ml) jusqu'à l'élimination complète de l'acide chlorhydrique et l'obtention d'un pH compris entre 5,5 et 7.
- Le résidu sec est repris dans 0,3 ml d'eau distillée.
- 15 µl de chaque hydrolysat, ainsi que 25 microlitres d'une solution aqueuse à 0,01 M d'acide diaminopimélique (mélange des isomères LL et DL) et d'une solution aqueuse de glycine à 0,2% (utilisés comme témoins) sont déposés sur du papier Whatman n° 1 (60 x 50 cm).
- Les papiers sont développés pendant 18 h par chromatographie descendante à front perdu dans un solvant composé de méthanol, d'eau distillée, d'acide chlorhydrique 10 N et de pyridine (80/17,5/2,5/10 en volumes).
- Après séchage du papier à température ambiante, la révélation des chromatogrammes se fait à l'aide d'une solution de ninhydrine à 0,2% (w/v) dans de l'acétone suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5 min.

Les taches de DAP sont de couleur olive virant par la suite au jaune vif. La forme LL migre plus vite que la forme DL (cette dernière ayant un Rf d'environ 0,8 par rapport à la forme LL). La glycine apparaît de couleur violette et migre plus rapidement que les isomères de DAP.

### **2.3. Analyse des sucres**

Cette analyse consiste à caractériser les sucres cellulaires après une hydrolyse ménagée avec de l'acide sulfurique. La méthode utilisée est celle de Lechevalier et Lechevalier (1970) et Stanek et Roberts (1974). Les étapes réalisées sont les suivantes:

- 50 mg de mycélium sec sont hydrolysés par 1 ml d'acide sulfurique 1 N dans des tubes scellés à 100°C pendant 2 h.
- Les hydrolysats sont neutralisés avec une solution saturée d'hydroxyde de baryum jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Le précipité blanc qui se forme est éliminé par centrifugation (4000 g pendant 20 min) et le surnageant est recueilli.
- Le surnageant est évaporé à sec à 40°C, puis repris dans 0,3 ml d'eau distillée.
- 5 µl sont spotés en bandes fines (environ 1 cm de largeur) sur plaques de cellulose (20 x 20 ou 10 x 20 cm) de 0,3 mm (Merck 2330). La plaque est mise dans une cuve à chromatographie (chromatographie ascendante) contenant un système de solvants composé d'acétate d'éthyle, de



pyridine et d'eau (50; 17,5; 12,5 v/v/v). Une solution aqueuse à 0,01 M, contenant le rhamnose, le ribose, le xylose, l'arabinose, le glucose et le galactose, est utilisée comme standard.

- Les chromatogrammes sont révélés à l'aide d'une solution aqueuse de phtalate d'aniline à 0,2% (w/v) en chauffant 5 min à 100°C. Les taches sont de couleur rose pour les pentoses et brune pour les hexoses. Les sucres apparaissent dans l'ordre de migration suivant (de haut en bas): rhamnose (vert-brun), ribose, xylose et arabinose (rose), glucose puis galactose (brun). Cet ordre a pu être déterminé en spotant les sucres séparément et en mélange.

## **2.4. Identification des phospholipides membranaires**

L'identification des phospholipides membranaires a été faite uniquement pour les actinobactéries qui se sont révélées appartenir à un nouveau genre ou une nouvelle espèce.

La méthode utilisée est celle préconisée par Minnikin *et al.* (1977).

- 1 mg de mycélium sec est agité durant une nuit à température ambiante dans 40 ml du mélange chloroforme-méthanol (2-1; v/v) contenu dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml hermétiquement fermée.

- L'extrait organique est récupéré et évaporé à sec à 37°C à l'aide d'un évaporateur rotatif.

- Le résidu est dissout dans 0,3 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (2-1, v/v).

- L'analyse est faite par chromatographie sur couche mince (CCM) bidimensionnelle en utilisant deux systèmes de solvants:

\* Solvant n° 1: chloroforme-méthanol-eau: 65/25/4, en volumes.

\* Solvant n° 2: chloroforme-acide acétique (glacial)-méthanol-eau: 80/15/12/4, en volumes.

Les plaques de gel de silice (G 60) sont régénérées à 120°C pendant 30 min. Les échantillons sont spotés (à raison de 10 µl par échantillon) à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque (20 x 20 cm). Dans un premier temps, la plaque est placée dans une cuve (atmosphère préalablement saturée) et développée par le système de solvant n° 1. Après développement (sur une longueur de 10 cm), la plaque est retirée de la cuve, puis séchée au sèche-cheveux. Elle est ensuite tournée d'un angle de 90° (rotation dans le sens d'une aiguille d'une montre), puis placée dans une autre cuve de chromatographie pour subir un deuxième développement (sur une longueur de 10 cm) avec le système de solvant n° 2. Après cette seconde migration, la plaque est retirée et séchée.

Pour chaque souche, cette expérience est réalisée dans 5 plaques de gel de silice de telle sorte que chaque plaque soit révélée par un révélateur chimique différent. Ces révélateurs, qui sont donc au nombre de cinq, sont les suivants: le bleu de molybdène (qui révèle tous les phospholipides), la

nynhidrine (qui révèle les phospholipides azotés), le réactif de Dragendorff (qui révèle la phosphatidylcholine), l'anisaldéhyde et le molybdate acide sulfurique (qui révèlent les lipides et les glycolipides). La composition de ces révélateurs est donnée en annexe. Pour reconnaître exactement l'emplacement de chaque phospholipide, une plaque contenant les phospholipides témoins est réalisée; elle consiste à spoter 10 µl d'une solution de phospholipides (pris séparément ou en mélange) à raison de 0,01 g dans 1 ml de chloroforme. La migration est faite exactement dans les mêmes conditions que les essais précédents.

## **2.5. Identification des acides gras membranaires**

L'identification des acides gras a été faite uniquement pour les actinobactéries qui se sont révélées appartenir à des taxons originaux.

L'expérience a été faite au Laboratoire de Microbiologie de la "German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)", Braunschweig, Allemagne. L'analyse a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse, selon la méthode de Sasser (1990). Quarante milligrammes de mycélium de chaque souche sont récoltés et placés dans des tubes en verre fermés par des bouchons en téflon.

### **2.5.1. Saponification**

C'est une étape importante; elle permet de libérer les acides gras des autres lipides. Pour cela 1 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (45 g d'hydroxyde de sodium, 150 ml de méthanol, et 150 ml d'eau distillée) est additionnée à 40 mg de mycélium contenu dans un tube. Le tube est bien scellé, vortexé pendant 5 min et chauffé dans un bain marie à 100°C pendant 5 min, puis vortexé une seconde fois 5 à 10 s avant d'être remis au bain marie à 100°C pendant 25 min.

### **2.5.2. Méthylation**

Cette étape permet d'obtenir des méthyles esters d'acides gras (pour augmenter leur volatilité dans une colonne partiellement polaire de CPG et diminuer leur solubilité dans la phase aqueuse). Deux millilitres du réactif 2 (réactif de méthylation), composé de 325 ml de HCl 6 N et de 275 ml de méthanol sont rajoutés aux différents tubes à analyser, lesquels sont ensuite scellés. Les tubes sont vortexés pendant 5 à 16 s, puis incubés au bain marie à 80°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) pendant 10 min. Ils sont ensuite refroidis à température ambiante.

### 2.5.3. Extraction

1,25 ml d'un mélange de *n*-hexane et d'heptane (v/v) sont ajoutés aux tubes de méthylation refroidis. Les tubes, bien fermés, sont agités doucement pendant 10 min par une table d'agitation (agitation par inclinaison des tubes). La phase inférieure (phase aqueuse) est ensuite éliminée par pipetage et la phase supérieure (phase organique) est conservée pour l'étape suivante.

### 2.5.4. Lavage

Une solution d'hydroxyde de sodium (10,8 g hydroxyde de sodium dissouts dans 900 ml d'eau distillée) est ajoutée à la partie restante dans les tubes d'extraction. Cette étape permet d'éliminer les contaminants.

### 2.5.5. Détection des acides gras

Les extraits obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. L'appareil, modèle Thermoscientifique, est composé d'un injecteur, modèle Trace GC 2000 et d'un détecteur de masse, modèle Trace DSQ. Les conditions de l'analyse sont les suivantes:

- Colonne Zebron (ZB 5MS, 30 mètres, 0,25 mm, 0,25 µm) société Phenomenex (USA).
- Température de ligne de transfert: 220°C.
- Mode d'injection Split/Splitless.
- Programme d'analyse: température initiale du four, 65°C pendant 0,5 min, 60°C jusqu'à 140°C pendant 4 min, 140°C jusqu'à 240°C pendant 4 min et 240°C pendant 15 min.
- Débit: 1 ml/min sous hélium (qualité α2).
- Programme du détecteur: multiplication des électrons à 1453 Volts, température de source d'ions à 200°C, gamme de masse: 40 à 450 en UMA (Unité de Masse Atomique), enregistrement des données de 6 à 35 min (après 6 min, temps nécessaire pour éliminer le solvant d'extraction).
- Un standard composé d'esters méthyliques d'acides gras (10 mg/ml) est utilisé.

Les chromatogrammes obtenus sont analysés et comparés aux standards utilisés et les résultats finaux sont exprimés en pourcentage pour chaque acide gras présent.

## 2.6. Identification des ménaquinones membranaires

L'identification des ménaquinones a été faite uniquement pour les actinobactéries qui se sont révélées appartenir à de nouveaux taxons.

Les ménaquinones sont extraites suivant la procédure de Minnikin *et al.* (1984), et sont analysées par HPLC (Kroppenstedt, 1982, 1985). Cette analyse a été réalisée au laboratoire de DSMZ (Braunschweig, Allemagne).

- A 100 mg de biomasse sont additionnés 2 ml d'une solution saline de méthanol (composée de 10 ml de NaCl à 0,3% dans de l'eau et de 100 ml de méthanol) et 2 ml d'éther de pétrole (60–80°C).
- Le mélange est homogénéisé durant 15 min puis centrifugé à une faible vitesse pendant 5 min.
- A la phase aqueuse obtenue, est additionné 1 ml d'éther de pétrole (60–80°C). Après une homogénéisation durant 15 min, suivie d'une centrifugation pendant 5 min, le surnageant est concentré à sec.
- Le résidu sec est dissout dans 100 µl d'acétone.

Les échantillons sont ainsi prêts à être chromatographiés sur couche mince (plaques de 20 x 20 cm, gel de silice GF 254 nm type 60, épaisseur de la couche de gel, 0,5 mm). Des standards connus sont utilisés pour l'analyse des quinones. Les plaques sont développées dans le système de solvants éther de pétrole-diéthyl éther (85:15 v/v). Elles sont ensuite séchées sous hotte et visualisées sous UV. Les quinones apparaissent de couleur bleu sombre sur un fond vert fluorescent à 254 nm. Les spots marqués sont grattés et repris dans le diéthyléther. L'échantillon est séché, dissout dans 100 µl d'isopropanol et filtré, puis transféré dans un tube à essai de 1 ml.

Les extraits sont analysés par chromatographie sur couche mince ou par chromatographie liquide à haute performance à DSMZ (Braunschweig, Allemagne).

### 3. Etude physiologique et taxonomie numérique

#### 3.1. Etude physiologique

Cette étude a été réalisée pour les 91 isolats d'actinobactéries, à raison de 63 tests par isolat.

##### 3.1.1. Utilisation des glucides et dérivés

Cette étude est réalisée sur le milieu préconisé par Gordon *et al.* (1974) additionné de 10 g/l de chaque glucide (composition en annexe). Les différents glucides et dérivés testés sont les suivants: adonitol, L-arabinose, D-cellobiose, *méso*-érythritol, D-fructose, D-galactose, D-glucose, glycérol, D-lactose, *myo*-inositol, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, D-mélézitose, D-mélibiose, D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, D-saccharose, salicine, D-sorbitol, D-tréhalose et D-xylose. Les glucides sont stérilisés sous hotte axénique à l'éther durant une nuit. Une fois bien séchés, ils sont ajoutés au milieu

de base de façon à obtenir une concentration finale de 1% (w/v). Après ensemencement et incubation de 3 semaines à 30°C, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les glucides par rapport à celles obtenues sur le milieu sans source de carbone (témoin négatif) et sur le milieu contenant 1% de glucose (témoin positif).

### **3.1.2. Utilisation de différentes sources d'azote**

L'expérience est réalisée selon Locci (1989). Les différents composés azotés testés dans cette étude sont les suivants: L-proline, L-alanine et L-sérine. Les acides aminés (stérilisés à l'éther, comme pour les glucides) sont ajoutés aseptiquement au milieu de base (voir annexe). Après ensemencement et incubation de 3 semaines à 30°C, la croissance est estimée sur les boîtes contenant les différentes sources d'azote par rapport à celle obtenue sur le milieu sans source d'azote (témoin négatif).

### **3.1.3. Décarboxylation des acides organiques**

La décarboxylation de 9 acides organiques (sous forme de sels de sodium) est étudiée selon la méthode de Gordon *et al.* (1974). Les acides organiques sont ajoutés à raison de 2 g/L au milieu de base contenant du rouge de phénol à 0,04% et à pH 6,8 (milieu coloré en jaune). La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

Les acides organiques testés sont les suivants: l'acétate, le benzoate, le butyrate, le citrate, l'oxalate, le propionate, le pyruvate, le succinate et le tartrate.

### **3.1.4. Dégradation de la xanthine, de l'hypoxanthine, de l'adénine, de la tyrosine et de la guanine**

Ces tests sont effectués selon la méthode de Gordon *et al.*, 1974. Ils consistent à observer s'il y a hydrolyse ou non de la xanthine, de l'hypoxanthine, de l'adénine, de la tyrosine et de la guanine. Pour cela, 0,4 g de chaque composé (sauf pour la guanine: 0,2 g) est suspendu dans 10 ml d'eau distillée. Cette suspension préalablement stérilisée à 120°C pendant 20 min est mélangée aseptiquement à 100 ml de gélose nutritive stérilisée séparément de la même manière. L'ensemencement se fait par point (2 points par souche). Après incubation de 7 à 30 jours, un résultat positif se manifeste par un éclaircissement autour des colonies).

### **3.1.5. Dégradation de la caséine du lait** (Gordon et al., 1974)

Les souches d'actinobactéries sont ensemencées sur milieu gélosé stérile contenant 5% de lait écrémé. L'apparition des zones claires autour des colonies après 7 à 20 jours d'incubation à 30°C témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

### **3.1.6. Dégradation de l'amidon** (Marchal et Bourdon, 1973)

Les souches d'actinobactéries sont ensemencées sur milieu gélose nutritif contenant 1% (w/v) d'amidon soluble. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la culture est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. Les zones contenant de l'amidon se colorent en bleu.

### **3.1.7. Dégradation de la gélatine** (Marchal et Bourdon, 1973)

Les souches d'actinobactéries sont cultivées sur milieu gélose nutritif contenant 4% (w/v) de gélatine pendant 14 jours à 30°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient après addition du réactif de Frazier. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse.

### **3.1.8. Dégradation de l'esculine et de l'arbutine**

Les souches sont cultivées sur le milieu préconisé par Marchal *et al.*, (1987) à base d'esculine ou d'arbutine (composition du milieu donnée en annexe). La dégradation de ces deux hétérosides se manifeste par l'apparition d'un pigment brun à noir autour des colonies après 2 à 4 jours d'incubation à 30°C.

### **3.1.9. Dégradation du Tween 80** (Sierra, 1957)

Ce test met en évidence la dégradation du Tween 80 (composition du milieu donnée en annexe) qui se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

### **3.1.10. Production de nitrate réductase** (Marchal et Bourdon, 1973)

Ce test consiste à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le milieu de culture. Si ils sont présents, ils donnent une réaction colorée rose en présence d'acide sulfanilique et de naphtylamine. Ces réactifs portent le nom de réactifs de GRIESS.

### 3.1.11. Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Pour évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis de certains agents physiques et chimiques, certains tests préconisés dans la taxonomie des actinobactéries sont choisis, à savoir:

- Sensibilité au lysozyme à 0,005% (Gordon et Barnett, 1977).
- Sensibilité aux pH 5 et 9 (sur bouillon nutritif), aux températures: 20, 30 et 45°C et aux antibiotiques (sur gélose nutritive) suivants: érythromycine (15 mg/l), tétracycline (30 mg /l) et acide nalidixique (30 mg/l).
- Sensibilité à différentes concentrations de NaCl à savoir: 0, 7, 10, 15, 20, 25 et 30% sur gélose nutritif. Le développement des souches est observé après 7, 14 et 28 jours d'incubation. La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la dernière concentration présentant encore une croissance.

### 3.2. Taxonomie numérique

La taxonomie numérique permet de comparer les microorganismes sur la base de caractères morphologiques, chimiques et physiologiques et de représenter leurs degrés de similitudes sous la forme de dendrogrammes. Cette étude a été réalisée sur 91 isolats d'actinobactéries halophiles provenant des sols sahariens. On calcule des indices de ressemblances entre nos souches.

La confection du dendrogramme est réalisée par la méthode non pondérée des regroupements paires utilisant la moyenne arithmétique (Unweighted Pair-Group Method using the Arithmetic Average ou UPGMA). Cette méthode minimise la distance entre les groupes en prenant la distance moyenne entre toutes les paires d'individus de l'échantillon.

Les données des tests physiologiques (63 tests) sont analysées par le logiciel SPSS (v. 16.0.1) suivant la démarche ci-dessous:

- Les données sont codées en chiffres « 1 » pour les tests positifs et « 0 » pour les tests négatifs et sont mises dans un tableau qui contient les variables sur les colonnes et les numéros de souches sur les lignes.
- La technique d'analyse choisie est la classification hiérarchique ascendante.
- Le critère d'agrégation est celui de la moyenne des distances non pondérées (UPGMA).
- L'indice utilisé est celui de Sokal et Michener qui tient en compte les similarités positives et négatives entre deux souches données. Sa formule est la suivante:

$$SA,B = \frac{SM^+ + SM^-}{SM^+ + SM^- + D}$$

SA,B = indice de similarité entre les souches A et B.

$SM^+$  = nombre de tests positifs, similaires entre A et B.

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

D = nombre de tests différents entre A et B.

#### **4. Etude moléculaire des actinobactéries halophiles**

##### **4.1. Extraction de l'ADN total**

La méthode utilisée pour l'extraction de l'ADN est celle de Liu *et al.* (2000). L'ADN est obtenu à partir d'un prélèvement direct des colonies sur milieu solide CMA contenant 15% de NaCl. Après lavage du mycélium à l'eau bidistillée stérile, celui-ci peut être immédiatement utilisé pour l'extraction de l'ADN ou bien conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour une utilisation ultérieure.

- Mettre dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml, 500  $\mu\text{l}$  de la solution de lyse composée de:
  - \* Tris-HCl [pH 8,0]: 400 mM.
  - \* EDTA [pH 8,0]: 60 mM.
  - \* NaCl: 150 mM.
  - \* Sulfate de sodium dodecyl: 1%.
- Ajouter, en dispersant, une petite quantité de mycélium à l'aide d'une spatule stérile et laisser pendant 10 min à température ambiante.
- Ajouter 150  $\mu\text{l}$  d'une solution composée de 60 ml d'acétate de potassium 5 M, 11,5  $\mu\text{l}$  d'acide acétique glacial et 28,5  $\mu\text{l}$  d'eau distillée (le pH final de cette solution est de 4,8). Vortexer brièvement, centrifuger à 10 000 g pendant 1 min, transvaser le surnageant dans un autre tube Eppendorf, centrifuger comme précédemment et transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter un volume égal d'isopropanol et mélanger le tube brièvement par inversion, puis centrifuger à 10 000 g pendant 2 min et éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN avec 300  $\mu\text{l}$  d'éthanol à 70%, centrifuger à 10 000 g pendant 1 min, éliminer le surnageant et sécher le culot (l'ADN) à l'air; suspendre de nouveau le culot dans 50  $\mu\text{l}$  d'eau bidistillée stérile.

##### **4.2. Amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S par PCR (Meklat A., 2012)**

Il s'agit d'une amplification élective d'une séquence d'ADN double brin, effectuée *in vitro* par extension itérative de deux amorces:



\* 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3').

\* 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Le mélange réactionnelle (50 µl) est composé de 25 à 50 ng d'ADN génomique, 0,5 µM de chaque amorce 27f et 1492r, 1X du tampon PCR contenant le MgCl<sub>2</sub> (10 mM tris-HCL pH 9,0; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Triton X-100; 0,2 mg/ml BSA ou Bovine Serum Albumin); 200 µM du mélange désoxynucléoside triphosphate (dNTP) et 1,5 U de Taq ADN polymérase. La réaction d'amplification par PCR est réalisée dans un thermocycleur (BIORAD My Cycler<sup>M</sup>) permettant de programmer les durées et les températures des trois étapes d'un cycle ainsi que le nombre de cycles désirés: Après une dénaturation initiale à 98°C pendant 4 min, le programme d'amplification est exécuté durant 30 cycles (94°C pendant 1 min, 52°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min); le dernier cycle est suivi d'une phase d'élongation terminale à 72°C pendant 10 min, puis refroidi à 4°C. Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse pendant 1 h sur gel d'agarose à 0,8% en tampon TAE 1X (Tris Acétate-EDTA; Euromedex) additionné de 0,5 µg/ml de bromure d'éthydiuim (BET) et en présence d'un marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (Promega). Après migration le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées (bandes ~ 1500 paires de base).

#### **4.3. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et analyses phylogénétiques**

Le séquençage a été réalisée pour les 60 isolats d'actinobactéries représentatifs des clusters. Le séquençage est effectué au Laboratoire de Microbiologie de DSMZ (Collection of Microorganisms and Cell Cultures Germany) en Allemagne. Les séquences, une fois déterminées, sont comparées à celles des espèces disponibles dans les banques génomiques de données en utilisant le "NCBI Blast" disponible sur Internet au niveau du site Web: [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) ainsi que EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012). Elles sont ensuite alignées grâce au logiciel MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4). Ce logiciel nous a permis de réaliser une analyse phylogénétique basée sur l'homologie entre ces séquences, selon la méthode de Jukes et Cantor (1969) pour le calcul des matrices des distances d'évolution et l'algorithme du "Neighbor-Joining" (Saitou et Nei, 1987) pour la construction des topologies des arbres phylogénétiques. Nous avons utilisé en plus du « Neighbor-Joining », la méthode du « Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981) avec le modèle de Kimura's two-parameters » (Kimura, 1980), ainsi que la méthode du « Maximum Parsimony » (Fitch, 1977). La validation statistique des liens phylogénétiques établis est effectuée par le test du Bootstrap (Felsenstein, 1985).

#### 4.4. Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN a été réalisée au laboratoire de la "German Collection of microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)" (Allemagne). Cette méthode consiste en la réassociation des brins linéaires complémentaires d'ADN cibles et les brins de la sonde. La méthode utilisée est celle préconisée par De Ley *et al.* (1970) modifiée par Huss *et al.* (1983). Le but est d'hybrider deux ADN de deux souches bactériennes. La première est une souche de référence dont le nom est connu, alors que la deuxième est supposée proche de la première. Puis par la suite, le pourcentage de renaturation entre les deux ADN est mesuré. Elle a été effectuée pour les souches H137, H150, H151, H195, H225, H254 et H255 qui ont été choisies suite aux résultats intéressants obtenus après comparaison de leur gène codant pour l'ARNr 16S avec les espèces les plus proches (possibilité d'avoir de nouvelles espèces).

##### 4.4.1. Extraction de l'ADN

L'ADN génomique de nos isolats, ainsi que celui des souches de référence les plus proches phylogénétiquement a été obtenu par extraction physique en utilisant la « French press » à une pression de 700 à 1000 psi. La qualité de l'ADN extrait est vérifiée par spectrophotométrie.

##### 4.4.2. Dénaturation et hybridation

L'ADN de chacun des deux isolats, ainsi que celui des souches de référence, sont préparés comme suit:

- Dans le tube Eppendorf 1: mettre 400 µl d'ADN de la souche notée A, plus 0 ou 20 ou encore 10 µl de formamide.
- Dans le tube Eppendorf 2: mettre 400 µl d'ADN de la souche notée A et 400 µl d'ADN de la souche notée B, plus 0, 20 ou 10 µl de formamide.
- Dans le tube Eppendorf 3: mettre 400 µl d'ADN de la souche notée B, plus 0, 20 ou 10 µl de formamide.

Ces trois tubes sont vortexés et centrifugés pendant 1 min. 400 µl sont prélevés de chaque Eppendorf et sont mis dans des cuves en quartz. Les cuves sont dégazées de façon à éliminer complètement les bulles d'air, puis 2 gouttes d'huile minérale sont ajoutées à chaque cuve. Les cuves contenant les échantillons à analyser sont fermées avec des bouchons en Téflon et sont placées dans un appareil à hybridation. Les mesures sont réalisées pour 4 cuves contenant:

- 1<sup>ère</sup> cuve: le blanc correspondant au pourcentage de formamide utilisé lors de la mesure de

la courbe de fusion.

- 2<sup>ème</sup> cuve: l'ADN de la souche notée A.
- 3<sup>ème</sup> cuve: l'ADN des deux souches A et B.
- 4<sup>ème</sup> cuve: l'ADN de la souche notée B.

La dénaturation de l'ADN est obtenue par un système intégré à l'appareil d'hybridation (semblable à celui du thermocycleur) et il est programmé automatiquement par un ordinateur. Ce système permet l'augmentation de la température à 65°C pendant 20 min. Au cours de la dénaturation, une courbe de température de fusion de l'ADN est obtenue; cela permet de diminuer la température de fusion des échantillons. La dénaturation est réalisée à une température inférieure de 0,7°C à la température de fusion déterminée. L'hybridation est programmée ensuite automatiquement par ordinateur et dure 30 min.

#### 4.4.3. Lecture des résultats

La lecture des résultats est réalisée par un ordinateur pourvu d'un logiciel qui permet de lire la densité optique mesurée à 260 nm par un spectrophotomètre modèle "Cary 100 Bio UV/VIS" équipé d'un "Peltier-thermostated 6×6 multicell changer" et d'un contrôleur de température avec une sonde de température *in situ* "Varian Medical Systems, Palo Alto, CA". Les valeurs des taux d'hybridation sont calculées par un logiciel intégré au système de lecture et sont données directement. Un pourcentage d'hybridation inférieur à 70% indique que les deux souches appartiennent à des espèces différentes (Wayne *et al.*, 1987).

## IV. ETUDES DES PROPRIETES ANTAGONISTES

### 1. Criblage classique

L'effet antimicrobien de nos isolats d'actinobactéries est testé sur des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* MRSA 639c résistant à la méthicilline et *Bacillus subtilis* ATCC 6633), sur une bactérie à Gram négatif (*Klebsiella pneumoniae* E40, multirésistante aux antibiotiques), sur des champignons filamenteux (*Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829, *Penicillium expansum* PE1, *Aspergillus carbonarius* M333 et *Fusarium culmorum* FC1), et sur des levures (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226 et *Candida albicans* M3).

Les espèces de *Staphylococcus aureus*, d'*Umbelopsis ramanniana* et de *Candida albicans* sont pathogènes pour l'homme, tandis que *Penicillium expansum* et *Aspergillus carbonarius* sont toxigènes, et producteurs respectivement de patuline et d'ochratoxine A. *Fusarium culmorum* est phytopathogène et aussi toxigène pour l'homme.

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu solide est réalisée par la technique des cylindres d'agar (Shomura *et al.*, 1979) qui consiste à prélever des cylindres d'agar de chaque milieu de culture contenant l'isolat d'actinobactérie après une incubation préalable de 21 jours à 30°C à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et les déposer à la surface du milieu ISP2 gélosé préalablement ensemencé en masse par chaque souche indicatrice. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 2 h pour une meilleure diffusion de la substance bioactive, et sont ensuite incubées durant 24 à 48 h à 30°C. Les diamètres d'inhibition sont par la suite mesurés.

## 2. Criblage moléculaire (Meklat A., 2012)

La technique consiste à amplifier par PCR des gènes conservés codant pour des domaines de quelques enzymes impliquées dans la biosynthèse des antibiotiques par l'utilisation d'amorces spécifiques. Une série d'amorces listées dans le Tableau 8 sont utilisées pour détecter les gènes codant pour les domaines de "ketosynthase" (KS) et "d'acyl transferase" (AT) de la polyketide synthase type I (PKS-I), le domaine " $\alpha$ -ketoacyl synthase" de la polyketide synthase type II (PKS-II), la région N-terminal du gène d'"enediène polyketide synthase" (PKSE) qui est comprise dans le domaine "ketosynthase" (KS), et le domaine d'adénylation du gène de la "non ribosomal peptide synthetase" (NRPS).

**Tableau 10.** Liste des amorces utilisées pour l'amplification des PKSs et NRPS.

Amorces	Séquences (5'-3')	gènes cibles
<b>K1F</b>	5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'	PKS-I
<b>M6R</b>	5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'	
<b>KS<sub><math>\alpha</math></sub></b>	5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3'	PKS-II
<b>KS<sub><math>\beta</math></sub></b>	5'-TGG AANCCG CCGAABCCTCT-3'	
<b>EdyA</b>	5'-CCGCVACATCACSGSCCTCGCSGTGAACATGCT-3'	PKSE
<b>EdyE</b>	5'-GCAGGCKCCGTCSACSGTGTABCCGCCGCC-3'	
<b>A3F</b>	5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3'	NRPS
<b>A7R</b>	5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'	

**Note:** S = C (cytosine) ou G (guanine); Y = C ou T (thymine); B = C, G ou T; N = A (adénine), T, C ou G et V = A, C, ou G.

Le mélange réactionnel de 50  $\mu$ l est composé de 20 à 40 ng d'ADN matrice (obtenu par la méthode de Liu *et al.*, 2000), de 0,4  $\mu$ M du mélange de désoxynucléoside triphosphate (dNTP), 2  $\mu$ M de chaque amorce, le tampon 1X contenant le  $MgCl_2$  et 2,5 U de Taq ADN polymérase et 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Le programme du cycle thermique de la PCR inclut une dénaturation initiale à 98°C pendant 4 min, suivie de 30 cycles, avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min, une étape d'hybridation de 1 min, à 57,5°C avec K1F/M6R, à 58°C avec KS $\alpha$ /KS $\beta$ , à 62°C avec EdyA/EdyE et à 57°C avec A3F/A7R, suivie de l'étape d'extension pendant 2 min à 72°C. L'extension finale a été effectuée à 72°C pendant 10 min. Tous les produits d'amplification ont été examinés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%, et les bandes de 1200 à 1400 pb, 600 pb, 1400 pb et 700 à 800 pb ont été classées en tant que produits des gènes PKS-I, PKS-II, PKSE et NRPS respectivement.

**RESULTATS  
ET DISCUSSIONS**

## I. ISOLEMENT ET DISTRIBUTION DES ACTINOBATERIES MYCELIENNES DANS LES SOLS

### 1. Isolement et distribution

Les colonies d'actinobactéries mycéliennes halophiles apparaissent après 3 à 4 semaines d'incubation, sur les milieux d'isolements utilisés (CMA et CHV) additionnés de 15 ou de 20% de NaCl et de 50 mg/l d'actidione. Ces colonies sont reconnues par leur aspect macroscopique (petites colonies de 1 à 10 mm, souvent compactes et bien incrustées dans la gélose, et présence en général d'un mycélium aérien) et microscopique (présence de mycélium). Les résultats de l'isolement des actinobactéries à partir des 24 échantillons de sols analysés sont présentés dans le Tableau 11.

Les actinobactéries halophiles sont isolées à partir de tous les sols (sauf AB1, Aberda, région du M'zab), mais en quantités faibles à modérées. Nous notons une certaine variabilité de la densité en fonction des sols, des milieux et de la concentration en NaCl utilisée (15 ou 20%). Cette densité, selon les échantillons de sols, varie de 0,0 à 50,0 x 10<sup>2</sup> unités formant colonies (UFC) par gramme de sol sec (gss).

Les échantillons les plus riches (nombres obtenus sur milieu CHV à 15% de NaCl) sont: ZF2 (Zelfana, région du M'zab; 50,0 x 10<sup>2</sup> UFC/gss), Lioua (région de Biskra; 43,0 x 10<sup>2</sup> UFC/gss), SK3 (Sidi Khaled, région de Biskra; 31,0 x 10<sup>2</sup> UFC/gss), AHS1 (Ahbès, région du M'zab; 22,7 x 10<sup>2</sup> UFC/gss) et BG1 (Boughezoul, région de Médéa, 20,3 x 10<sup>2</sup> UFC/gss). Les échantillons les plus pauvres (entre 0,0 et 0,7 x 10<sup>2</sup> UFC/gss d'actinobactéries halophiles sur milieu CMA à 15% de NaCl) sont: AB1 (Aberda), AW (Awrir), ALL1 et ALL2 (Oued Ntissa) et ZF5 (Zelfana) qui proviennent tous de la région du M'zab. Les densités sont nettement plus élevées à 15% de NaCl par rapport à 20%, à l'exception des échantillons BG1 et surtout Lioua sur milieu CMA. Ceci s'explique par le fait que ce milieu (CMA) permet la croissance d'un nombre trop élevé de bactéries non mycéliennes, à croissance rapide, et qui empêche les actinobactéries (croissance lente) de croître; la diminution du nombre de bactéries non mycéliennes à 20% de NaCl permet aux actinobactéries mycéliennes de s'exprimer et de croître. De même, dans l'échantillon ZF2, aucune actinobactérie n'est détectée sur CMA (trop riche en bactéries non mycéliennes) alors que leur nombre est maximal sur CHV qui leur est très sélectif. Les densités obtenues des actinobactéries halophiles mycéliennes sont tantôt plus élevées sur milieu CMA (milieu riche mais non sélectif), tantôt sur milieu CHV (milieu pauvre mais très sélectif).

**Tableau 11.** Dénombrement des actinobactéries halophiles dans les échantillons de sols et codification des souches sélectionnées.

Région	Commune	Echantillons	Nombre de souches x 10 <sup>2</sup> UFC/gss (codes des souches prélevées)			
			Milieu CMA		Milieu CHV	
			15% NaCl	20% NaCl	15% NaCl	20% NaCl
M'zab	Ahbès	AHS1	4,3 (H139, H141, H142)	2,3 (H145, H147, H148)	22,7 (H149, H150, H151, H152, H154, H155, H195, H196, H197, H198, H199, H200, H201, H202, H225)	2,7 (-)
		AHS2	7,3 (H156, H159, H160, H221)	0 (-)	0,3 (-)	0 (-)
		PAL3	5,0 (H229)	1,3 (H133)	1,3 (H137)	0 (-)
	Aberda	AB1	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		AB2	6,7 (H176, H178, H180)	0,7 (H181, H182)	7,0 (H203, H206, H208, H209)	0 (-)
	Inghid	PAL2	0,7 (H245)	2,0 (H243, H244)	0 (-)	0 (-)
	Azrar	AZ1	2,0 (H165, H224)	0,3 (H166)	0,7 (H215)	0 (-)
		AZ2	2,3 (H167, H168, H169, H170)	0,3 (-)	0,7 (H212, H213)	0 (-)
	Awrir	AW	0,7 (H220)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
	Oudjoujen	PAL1	3,7 (H239, H240)	0 (-)	22,7 (-)	0 (-)
		AI	3,3 (H218)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
	Oued Ntissa	ALL1	0,3 (H248)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		ALL2	0,3 (H247)	0 (-)	0 (-)	0 (-)

**Note:** 0 : aucun isolat n'a été détecté. (-) = aucun isolat n'a été sélectionné.



Suite du tableau 11.

Région	Commune	Echantillons	Nombre de souche x 10 <sup>2</sup> UFC/gss (code des souches prélevée)			
			Milieu CMA		Milieu CHV	
			15% NaCl	20% NaCl	15% NaCl	20% NaCl
M'zab (suite)	Djaber	DJ	4,7 (H222, H223)	0 (-)	0,7 (H216, H217)	0 (-)
	Zelfana	ZF1	2,3 (-)	0 (-)	2,7 (H227)	0 (-)
		ZF2	0 (-)	0 (-)	50,0 (H231, H232, H233, H234, H235, H236, H238)	0 (-)
		ZF4	2,0 (H122, H124)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		ZF5	0,3 (H126)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
Biskra	Sidi Khaled	SK2	1,3 (H249)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
		SK3	9,3 (H250)	0 (-)	31,0 (-)	0 (-)
	Lioua	LIO	1,3 (-)	17,7 (H254, H255, H256, H257)	43,0 (H258, H261, H262)	0,7 (H260)
Médéa	Boughezoul	BG1	4,3 (-)	6,7 (H105, H106)	20,3 (H101, H102, H103, H104)	2,0 (H100)
		BG2	1,3 (-)	0 (-)	0,3 (H111)	0
M'sila	Magra (Oued El Maleh)	OMA	1,3 (-)	0,3 (H193, H194)	0 (-)	0 (-)

**Note:** 0 : aucun isolat n'a été détecté. (-) = aucun isolat n'a été sélectionné.

## 2. Choix des souches et purification

Sur la base de la diversité culturelle (aspect, couleur et diamètre des colonies, ainsi que la quantité du mycélium aérien) et morphologique (sporulation sur le mycélium aérien et le mycélium du substrat et fragmentation ou non de ce dernier), et aussi, sur la base de leur origine (échantillons différents) nous avons sélectionné les souches d'actinobactéries halophiles mycéliennes dans un but taxonomique. Ces actinobactéries appartiennent à des genres habituellement peu fréquents et dont la

micromorphologie est plus ou moins caractéristique, comme *Nocardiopsis*, *Actinopolyspora*, *Saccharomonospora* et diverses nocardioformes (ressemblant au genre *Nocardia* et apparentés).

Nous avons ainsi prélevé au total 91 isolats, 28 partir des sols d'Ahbès, 9 à partir d'Aberda, 11 à partir des sols de Zelfana, 8 de Boughezoul, 8 de Lioua, 3 d'Inghid, 11 d'Azrar, et entre 1 et 4 isolats à partir des sols de chacune des régions suivantes: Awrir, Oued Ntissa, Oudjoujen, Djaber, Sidi Khaled et d'Oued El Maleh. Au total, 91 souches halophiles ont été récoltées (Tableau 11).

### 3. Discussion

Les travaux de notre laboratoire ont montré toute la diversité des sols sahariens en actinobactéries mycéliennes (Sabaou *et al.*, 1992 et 1998; Boudjella, 1994; Zitouni *et al.*, 2004 et 2005; Badji *et al.*, 2006 et 2007; Lamari, 2006; Meklat *et al.*, 2011). Ces travaux ont abouti à la description de nouveaux taxons (non halophiles ou halophiles) qui ont ainsi été publiés (Zitouni *et al.*, 2004; Meklat *et al.*, 2012a; Boubetra *et al.* (2013a,b et 2015); Meklat *et al.* (2012a; 2013a,b,c et 2014a,b); Boudjelal *et al.*, 2015). Nous avons voulu approfondir les travaux sur ce groupe bactérien pour exploiter au maximum la diversité des sols sahariens en actinobactéries mycéliennes, notamment celles qui sont halophiles. Les campagnes d'échantillonnages réalisées au niveau de 24 sols provenant des régions du M'zab, de Biskra, de Médéa et de M'sila nous ont permis d'isoler 91 isolats présentant les caractéristiques culturelles et morphologiques des actinobactéries.

L'isolement des actinobactéries halophiles est effectué sur deux milieux de culture à 15 et 20% de NaCl. Le premier est le milieu CHV, à base de sels minéraux et de chitine comme unique source de carbone et d'azote, qui est préconisé par différents auteurs (Hayakawa et Nonomura, 1984; Boudjella, 1994; Pathom-aree *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010) pour le dénombrement des actinobactéries mycéliennes au détriment des bactéries non mycéliennes. En effet, les actinobactéries mycéliennes dégradent mieux la chitine par rapport aux autres microorganismes qui la dégradent difficilement ou pas. Ce milieu contient aussi des vitamines du groupe B comme facteurs de croissance et cela permet aux genres relativement rares et qui sont souvent auxotrophes pour ces vitamines de croître (Hayakawa et Nonomura, 1984). Le deuxième milieu est le milieu CMA qui est à base de peptone, d'extrait de levure, de citrate de sodium et d'une quantité importante de sulfate de magnésium. Ce milieu n'est pas connu comme un milieu d'isolement des actinobactéries mycéliennes mais permet une bonne croissance de celles qui sont halophiles (Chun *et al.*, 2000; Boudjelal *et al.*, 2011; Meklat *et al.*, 2011).

Sur ces milieux, nous avons récolté 91 isolats d'actinobactéries mycéliennes halophiles. Les densités les plus élevées (la maximale étant de  $50,0 \times 10^2$  UFC/gss) ont été obtenues à une concentration de 15% de NaCl. Ces densités sont plus élevées que celles obtenues par Meklat (2012a) (la maximale étant de  $18,6 \times 10^2$  UFC/gss) mais qui a utilisé une concentration de 20% de NaCl lui permettant de récolter 55 actinobactéries halophiles à partir de 9 régions sahariennes (Adrar, Béchar, Djelfa, El Goléa, El Oued, Ghardaïa, Laghouat et Ouargla). Des densités moindres ont également été obtenues avec 20% de NaCl par Zenova *et al.* (2011).

Il n'y a pas vraiment une corrélation entre la densité des actinobactéries mycéliennes halophiles et la salinité des sols. En effet, c'est dans la commune de Zelfana dont les sols sont très salés (les plus salés de tous: CE comprise entre 15,2 et 18,1 mS/cm) qu'on retrouve aussi bien la plus forte densité (échantillon ZF2) que l'une des plus faibles densités (ZF5). De même, les densités des actinobactéries halophiles des échantillons PAL1, SK3 et Lioua (sols modérément salés: CE comprise entre 2,5 et 4,2 mS/cm) sont plus élevées que celles des échantillons très salés ZF1, ZF4 et ZF5 de Zelfana. Ceci montre donc que d'autres facteurs pédologiques (en plus de la salinité) interviennent dans la distribution des actinobactéries halophiles dans les sols étudiés.

Le screening pour le choix des microorganismes dans un but taxonomique a toujours été une voie essentielle pour parvenir à de nouvelles espèces bactériennes. Il est pratiqué par de nombreux laboratoires qui se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus extrêmes et en mettant au point des méthodes de sélection favorisant des espèces rares (Hacène *et al.*, 1994; Sabaou *et al.*, 1998; Ouhdouch *et al.*, 2001; Khettabi *et al.*, 2002; Lemriss *et al.*, 2003). Pour notre part, nous avons sélectionné, 91 isolats d'actinobactéries mycéliennes halophiles, choisis à partir de tous les échantillons salés des régions étudiées et selon aussi leur diversité morphologique, et ce, dans un but taxonomique mais aussi d'une évaluation des potentialités antagonistes.

## **II. ETUDES PHENOTYPIQUE ET CHIMIOTAXONOMIQUE DES ACTINOBACTERIES MYCELIENNES HALOPHILES**

### **1. Etude morphologique**

Les caractères culturels ont été déterminés sur les milieux de cultures CMA, ISP2, ISP4 et GN. L'importance de la croissance, le développement du mycélium aérien sur chaque milieu, la

couleur du mycélium aérien et celui du substrat ainsi que la présence ou non de pigments diffusibles dans le milieu ont été observées. Pour cette étude, les 91 isolats d'actinobactéries halophiles ont été classés dans des groupes morphologiques plus ou moins homogènes.

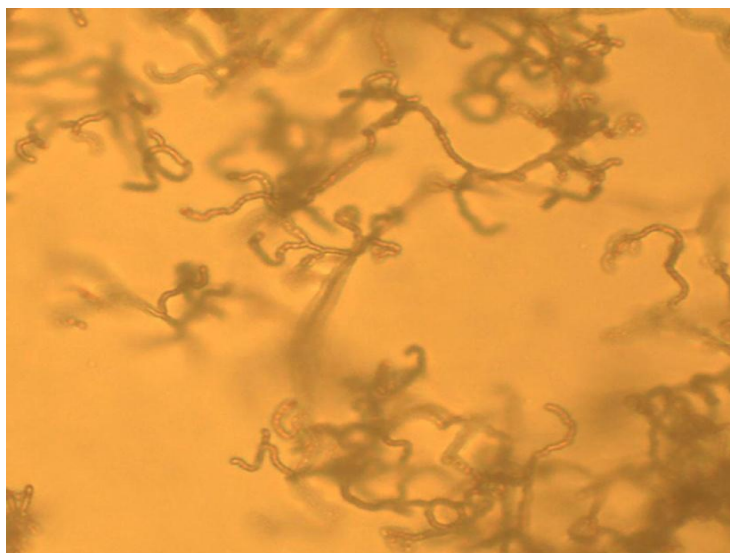
### 1.1. Groupe 1 (G1)

Seize isolats (H139, H141, H142, H156, H159, H160, H165, H176, H178, H180, H224, H239, H240, H248, H249 et H250) présentent des caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques très proches entre eux et sont rassemblés de ce fait dans un seul groupe morphologique: le groupe G1. Ces isolats sont caractérisés par un mycélium aérien (MA) ramifié et fragmenté de manière anarchique en éléments plus ou moins longs, non mobiles aboutissant à la formation de chaînes de spores en zigzag. Le MS se fragmente un peu (Figure 12). Tous les isolats de ce groupe ont un MA blanc ou beige-jaune et un MS non coloré sur ISP4 et beige pâle à beige jaunâtre sur les trois autres milieux testés (Tableau 12). Les pigments diffusibles ne sont pas sécrétés. Cette morphologie rappelle fortement celle du genre *Nocardiopsis*.

**Tableau 12.** Caractéristiques culturelles des 16 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G1.

Milieux de culture +15% de NaCl	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments diffusibles
CMA (complexe medium agar)	+++	++ beige à jaune	Brun jaunâtre	-
ISP2 (extrait de levure-extrait de malt agar)	+++	+ blanc beige	Beige jaune	-
ISP4 (amidon-sels inorganiques agar)	+	± blanc	Non coloré	-
GN (gélose nutritive)	+++	++ Beige-jaune	Beige pâle	-

**Note:** Croissance ou production: +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; ± = très faible; - = nulle.



**Figure 12.** Micromorphologie du MA en microscopie optique de l'isolat H156 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).

**Note:** Présence de chaînes de spores anarchiques.

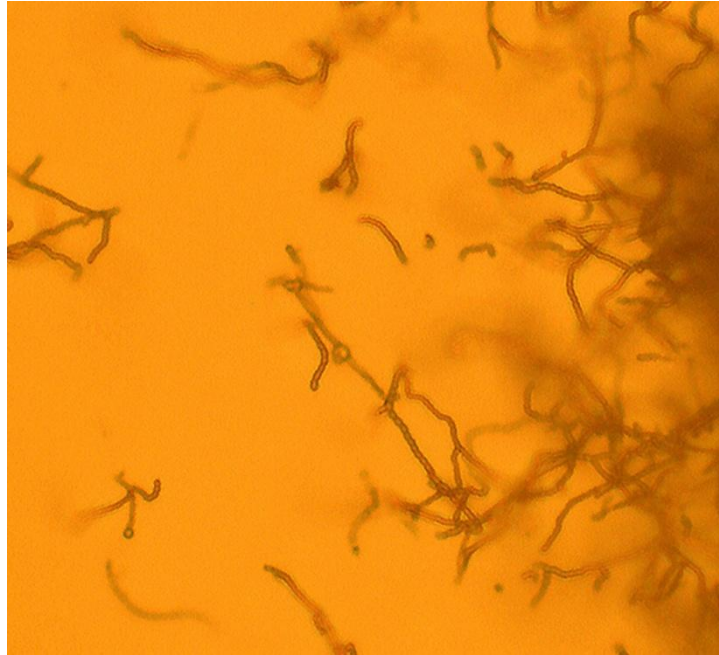
## 1.2. Groupe 2 (G2)

Ce groupe comprend 7 isolats (H122, H124, H231, H232, H235, H236 et H238) caractérisés par une micromorphologie identique. Le MA est blanc sur les milieux testés. Le MS est beige pâle à beige brunâtre. Les pigments diffusibles ne sont pas sécrétés, sauf pour l'isolat H122 qui produit un pigment rouge sur CMA, brun rougeâtre sur ISP2 et rose sur GN (Tableau 13). Le mycélium aérien se fragmente de manière anarchique en chaînes de spores (Figure 13a), tout comme celles du groupe G1. Mais à la différence de ce dernier groupe, le mycélium du substrat (qui se fragmente un peu) produit des spores isolées, sessiles ou portées chacune par un très court sporophore (Figure 13b). Cette morphologie est celle du genre *Streptomonospora*.

**Tableau 13.** Caractéristiques culturelles des 7 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G2.

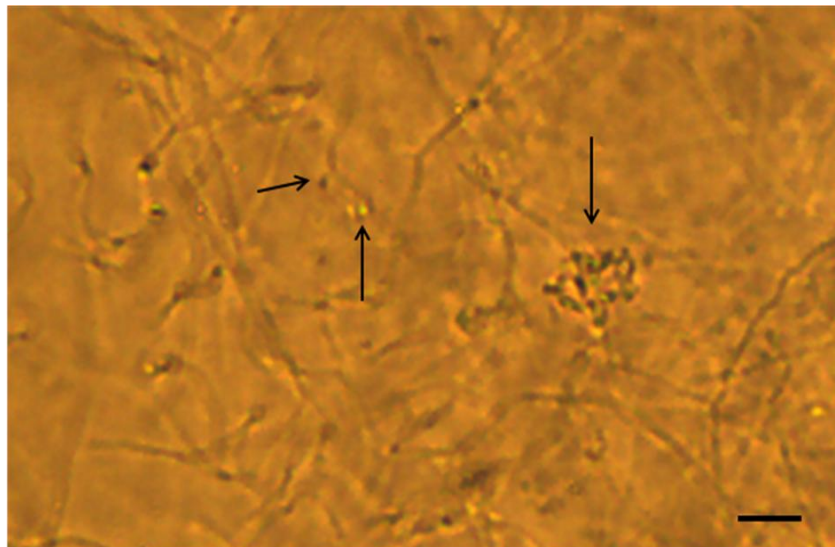
Milieux de culture + 15% de NaCl	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments diffusibles
CMA	+++	++ Blanc	Beige jaunâtre	- (rouge pour H122)
ISP2	+++	+ Blanc	Beige à beige brunâtre	- (brun rougeâtre pour H122)
ISP4	+++	++ Blanc	Beige pâle	-
GN	++	++ Blanc	Beige clair	- (rose pour H122)

**Note:** Croissance ou production: +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; - = nulle.



**Figure 13a.** Micromorphologie du MA en microscopie optique de l'isolat H231 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).

**Note:** Présence de chaînes de spores.



**Figure 13b.** Micromorphologie du MS en microscopie optique de l'isolat H231 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40) montrant les spores isolées (flèches). La barre indique 5  $\mu$ m.

### 1.3. Groupe 3 (G3)

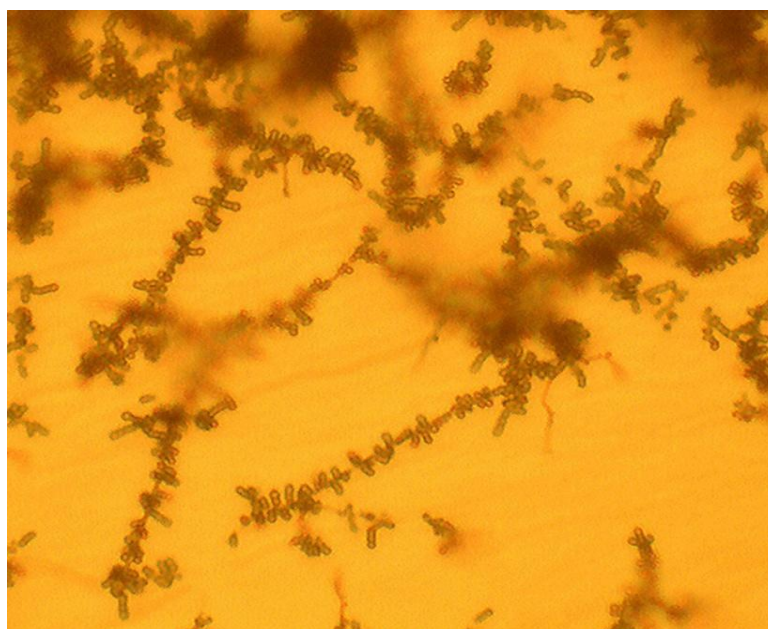
Dix neuf isolats appartenant à ce groupe sont identiques entre eux du point de vue micromorphologique. Ces isolats sont: H126, H155, H170, H196, H198, H203, H215, H216, H217, H218, H220, H221, H222, H223, H227, H229, H233, H234 et H247. Les filaments ramifiés du MA

portent d'une manière alternée des spores sessiles, isolées ou en paires (Figure 14). Le MS est stérile et non fragmenté. La sporulation est abondante sur les milieux utilisés. Les pigments diffusibles ne sont pas sécrétés, sauf pour l'isolat H196 qui produit un pigment brun diffusible sur le milieu CMA. Les caractéristiques culturelles des 19 isolats sont rapportées dans le Tableau 14. Nous avons pu rattacher, sur la base des observations microscopiques et des caractéristiques culturelles, les 19 isolats au genre *Saccharomonospora*.

**Tableau 14.** Caractéristiques culturelles des 19 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G3.

Milieux de culture + 15% de NaCl	Nombre d'isolats	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments diffusibles
CMA	18 1 ( H196)	++	++ Blanc-beige	Beige pâle	- Brun
ISP2	19	+++	++ Blanc-beige	Beige pâle	-
ISP4	19	++	+ Blanc	Non coloré à beige très pâle	-
GN	19	++	+ Blanc	Non coloré à beige très pale	-

**Note:** Croissance ou production: +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; - = nulle.



**Figure 14.** Micromorphologie du MA en microscopie optique de l'isolat H223 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).

**Note:** Spores isolées ou par paires, disposées de manière opposée.

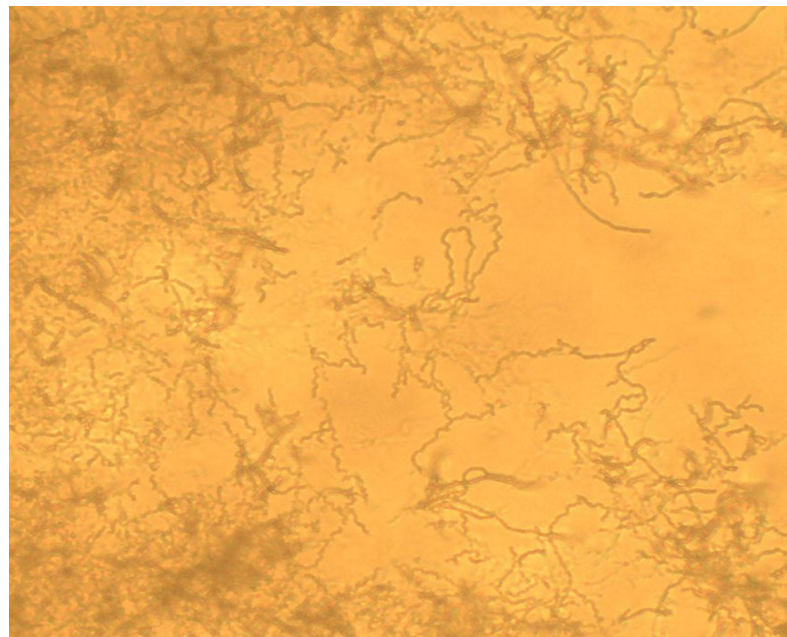
#### 1.4. Groupe 4 (G4)

Ce groupe bactérien contient 4 isolats: H137, H149, H206 et H225. Le MA forme de longues chaînes de spores, droites à flexueuses, de 10 à 50 spores par chaîne. Le MS se fragmente abondamment en zig-zag, en éléments en bâtonnets (Figure 15). Les quatre isolats ont un MA peu abondant et blanc et un MS beige clair ou très pâle à non coloré sur les milieux testés (Tableau 15). Cette morphologie rappelle celle du groupe des nocardioformes, notamment, du genre *Prauserella* qui est halophile tout comme nos isolats.

**Tableau 15.** Caractéristiques culturales des 4 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G4.

Milieux de culture +15%de NaCl	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments diffusibles
CMA	+++	-	Beige claire	-
ISP2	+++	++ Blanc	Beige-brun clair	-
ISP4	++	+ Blanc	Non coloré	-
GN	+++	+ Blanc	Non coloré à beige très pâle	-

**Note:** Croissance ou production: +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; - = nulle.



**Figure 15.** Micromorphologie du MS en microscopie optique de l'isolat H225 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).

**Note:** Les filaments du MS se fragmentent en zig-zag.



### 1.5. Groupe 5 (G5)

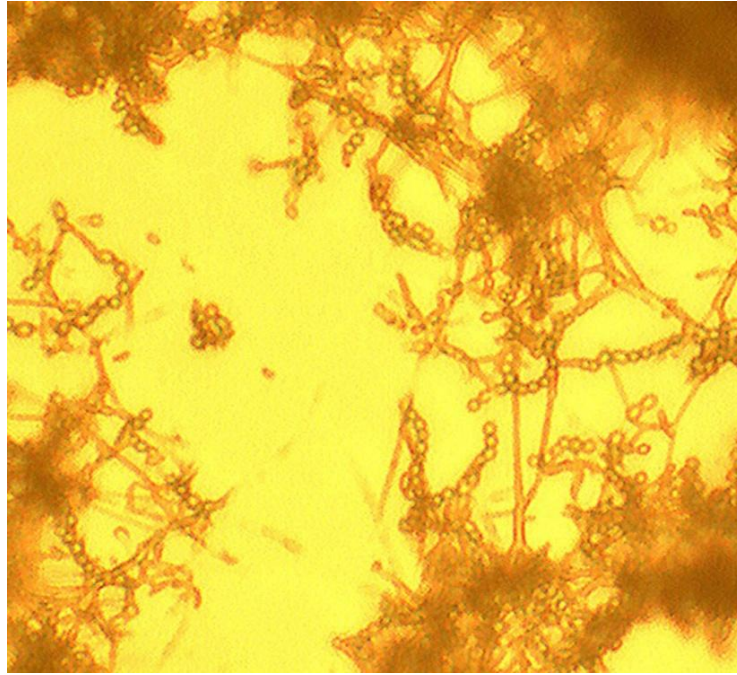
Ce groupe comprend 45 isolats dont les caractéristiques culturales sont rapportées dans le Tableau 16. Ces isolats présentent en général les mêmes caractéristiques culturales entre eux. Ils possèdent une bonne croissance sur les quatre milieux. Le MA forme des chaînes droites à flexueuses de 5 à 20 spores par chaîne (Figures 16). Les spores sont en bâtonnets ou ovoïdes. Le MA est généralement abondant ou moyennement produit et de couleur blanche ou beige pâle pour l'ensemble des isolats (Tableau 16). Le MS est beige clair ou parfois beige pâle ou non coloré, plus rarement rose clair (selon les milieux de culture et les isolats) comme c'est le cas de l'isolat H254. Les pigments diffusibles ne sont pas sécrétés, sauf pour l'isolat H254 qui produit un pigment brun foncé ou rose clair diffusible sur les milieux ISP4 et GN, respectivement. La sporulation est abondante sur ISP2, ISP4 et GN.

Cette morphologie rappelle celle du genre *Actinopolyspora*, dont les espèces sont toutes halophiles, et aussi du genre *Saccharopolyspora*, dont certaines espèces sont halophiles.

**Tableau 16.** Caractéristiques culturales des 45 isolats d'actinobactéries halophiles du groupe G5.

Milieux de culture +15% de NaCl	Nombre d'isolats	Croissance	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments diffusibles
<b>CMA</b>	45	+++	+++ Beige	Beige clair	-
<b>ISP2</b>	43 1 (H100) 1 (H254)	+++ ++ -	++ Blanc - -	Beige pâle  -	-
<b>ISP4</b>	42 2(H197, H212) 1 (H254)	++ + ++	++ Beige - ++ Blanc	Non coloré  Brun foncé	-  ++ Brun foncé
<b>GN</b>	43 1 (H152) 1 (H254)	++ +++ ++	++ Blanc beige - ++ Blanc rosâtre	Beige clair Beige clair Rose clair	- - + Rose clair

**Note:** Croissance ou production: +++ = bonne; ++ = moyenne; + = faible; - = nulle.



**Figure 16.** Micromorphologie du MA en microscopie optique de l'isolat H195 cultivé pendant trois semaines à 30°C sur le milieu GN additionné de 15% de NaCl (G x 40).

**Note:** Présence de chaînes de spores.

## **2. Etude chimiotaxonomique**

L'étude chimiotaxonomique, notamment celle concernant la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique, et la présence ou non de la glycine et des sucres, a été réalisée sur les représentants de chaque groupe morphologique, pris souvent d'échantillons différents. Les isolats retenus (23 au total) sont les suivants: H139, H165, H178, H239 et H250 (G1), H122 et H232 (G2), H196, H126, H217, H223 et H247 (G3), H137, H225 (G4), ainsi que H148, H150, H154, H194, H195, H202, H209, H212 et H254 (G5). L'analyse des phospholipides, des acides gras et des ménaquinones a été réalisée uniquement pour les nouveaux taxons (après confirmation par des tests moléculaires).

### **2.1. Détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et des sucres**

#### **2.1.1. Groupes G1 et G2**

Les représentants des groupes G1 et G2 possèdent les mêmes caractéristiques en ce qui concerne l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) et les sucres. En effet, tous les isolats possèdent dans leurs cellules l'isomère DL de DAP (sans glycine) et du galactose, du glucose et du ribose comme sucres. Des traces de xylose sont notées chez l'isolat H122 du groupe 2 (Tableau 17).

Ces caractéristiques correspondent bien à celles des *Nocardiopsis* et des *Streptomonospora* auxquels on a rattachés respectivement les groupes G1 et G2

**Tableau 17.** Détermination de l'isomère de DAP et des sucres chez les isolats représentant les groupes 1 et 2.

Sucres	Isolats	
	Groupe G1	Groupe G2
	H139, H165, H178, H239 et H250	H122 et H232
Arabinose	-	-
Galactose	+	+
Ribose	+	+
Glucose	± ou +	+ (± pour H122)
Xylose	-	- (± pour H122)

**Note:** + = présence ; - = absence. ± : traces. Toutes les souches contiennent du DL-DAP sans glycine.

### 2.1.2. Groupes G3, G4 et G5

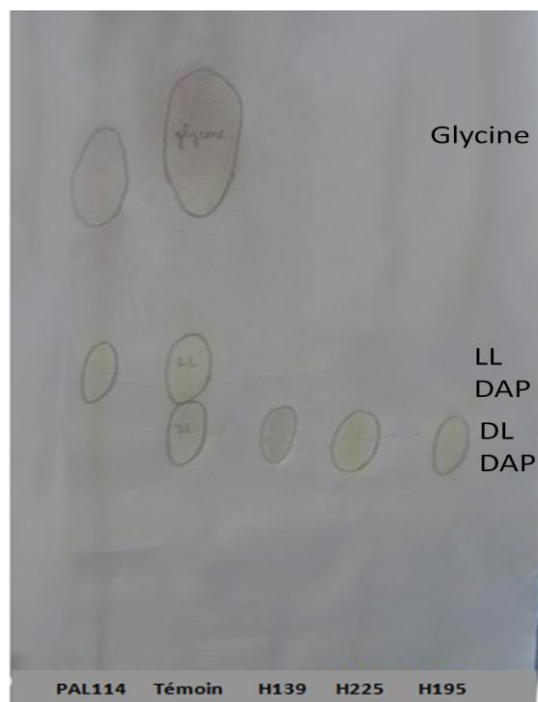
L'étude chimique des constituants cellulaires a révélé chez tous les isolats d'actinobactéries halophiles des groupes 3, 4 et 5 la présence du DL DAP (sans glycine), et de l'arabinose et du galactose comme sucres caractéristiques, en plus du ribose, alors que le glucose et des traces de xylose ne sont détectés que pour certains isolats (Tableau 18). Ces caractéristiques sont celles des *Saccharomonospora* (G3), *Prauserella* (G4), *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora* (G5).

Des exemples de mise en évidence de l'isomère de l'acide diaminopimélique, de la glycine et des sucres sont illustrés par les Figures 17 et 18.

**Tableau 18.** Détermination de l'isomère de DAP et des sucres chez les isolats représentant les groupes 3, 4 et 5.

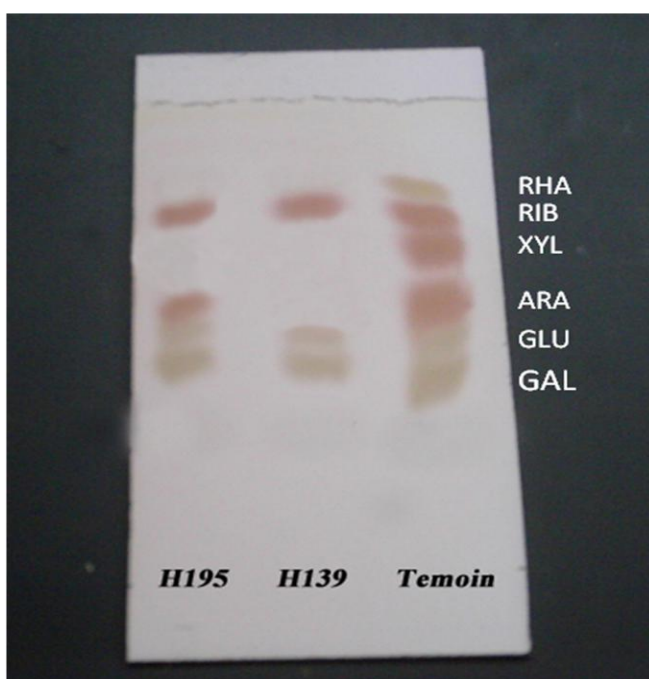
Sucres	Isolats		
	Groupe G3	Groupe G4	Groupe G5
	H196, H126, H217, H223 et H247	H137, H225	H148, H150, H154, H194, H195, H202, H209, H212 et H254
Arabinose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Ribose	+	+	+
Glucose	+	+	v
Xylose	-	-	- ou traces

**Note:** + = présence; - = absence. ± : traces. v, variable selon les isolats. Tous les isolats contiennent du DL DAP sans glycine. Le glucose est présent uniquement chez les isolats H150, H194, H195 et H212. Des traces de xylose sont présents chez les isolats H148 et H194.



**Figure 17.** Exemple de mise en évidence de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) par chromatographie sur papier.

**Note:** Souches H195 (groupe G5), H225 (groupe G4) et H139 (groupe 1). Le témoin est un mélange de LL et de DL DAP (la forme LL migre plus vite). La souche PAL 114 est une souche de *Streptomyces* de notre laboratoire et qui possède l'isomère LL de DAP; elle est prise comme témoin et contient le LL DAP et la glycine.



**Figure 18.** Exemple de mise en évidence des sucres par CCM (plaque de cellulose).

**Note:** Souche H195 (groupe G5) et H139 (groupe G1). Le témoin est composé du rhamnose (RHA), ribose (RIB), xylose (XYL), arabinose (ARA), glucose (GLU) et galactose (GAL).

## 2.2. Détermination des acides gras, des ménaquinones et des phospholipides

Ces analyses n'ont été faites que pour quatre isolats (H225, H150, H195 et H254) dont les résultats ont montré que ce sont de nouveaux taxons (les résultats sur les taxons originaux seront présentés ultérieurement après les études moléculaires). Ces résultats sont présentés dans le Tableau 19.

**Tableau 19.** Composition des quatre isolats d'actinobactéries mycéliennes halophiles en acides gras, en ménaquinones et en phospholipides.

Acides gras (%)	Isolats			
	H225	H150	H195	H254
Iso-C <sub>15:0</sub>	-	29,9	27,3	28,0
Antéiso-15:0	-	4,3	4,4	7,9
Iso-C <sub>16:0</sub>	38,4	11,3	18,4	5,1
Iso-C <sub>16:0</sub> 2OH	11,0	-	-	-
Iso-C <sub>17:0</sub>	-	20,2	15,8	12,3
Cis9-C <sub>16:1</sub>	9,6	-	-	-
IsoH-C <sub>16:1</sub>	8,1	-	-	-
Cis9 iso-C <sub>17:1</sub>	7,7	6,9	8,2	-
Antéiso-C <sub>17:0</sub>	11,5	16,4	15,7	32,8
<b>Ménaquinones (%)</b>				
MK-8(H <sub>4</sub> )	-	-	-	-
MK-9(H <sub>0</sub> )	-	5,3	7,9	2,1
MK-9(H <sub>2</sub> )	-	2,1	1,7	3,2
MK-9(H <sub>4</sub> )	90,3	78,7	72,1	62,3
MK-9(H <sub>6</sub> )	-	3,5	8,7	-
MK-9(H <sub>8</sub> )	-	0,4	2,4	-
MK-10(H <sub>2</sub> )	-	-	-	0,8
MK-10(H <sub>4</sub> )	-	0,7	0,9	28,0
MK-10(H <sub>6</sub> )	-	-	-	1,2
Non identifié	9,7	5,2	6,8	-
Phosphatidylcholine	+	+	+	+
Phosphatidyléthanolamine	+	-	-	-
Phosphatidylinositol	+	+	+	-
Phosphatidylinositol mannosides	+	-	-	-
Glycolipide inconnu (non déterminé)	+	+	+	+
Diphosphatidylglycerol	-	+	+	+
Phosphatidylglycerol	-	+	+	+

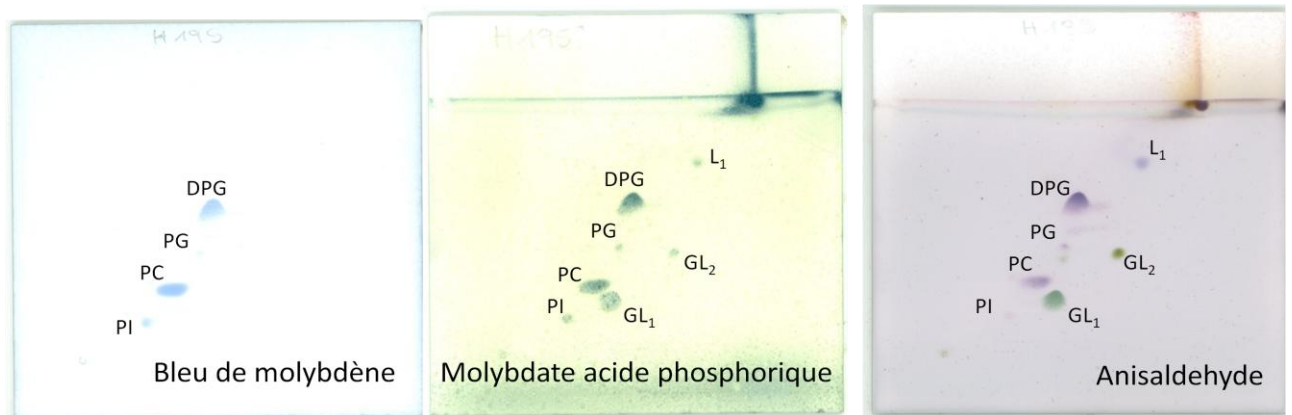
**Note:** + = présent; - = absent. La souche H137 présente en plus la méthyl-phosphatidyléthanolamine, l'hydroxy-phosphatidyléthanolamine et la méthyl-hydroxy phosphatidyléthanolamine.

Les acides gras majoritaires (supérieurs à 10% par rapport au total des acides gras) sont l'iso-C<sub>16:0</sub> et à un degré moindre l'anteiso-C<sub>17:0</sub> et iso C<sub>16:0</sub> 2OH pour l'isolat H225, l'iso-C<sub>15:0</sub>, l'iso-16:0, l'iso-C<sub>17:0</sub> et l'antéiso-C<sub>17:0</sub> pour les isolats H150 et H195, et l'iso-C<sub>15:0</sub>, l'iso-C<sub>17:0</sub> et l'antéiso-C<sub>17:0</sub> pour l'isolat H254.

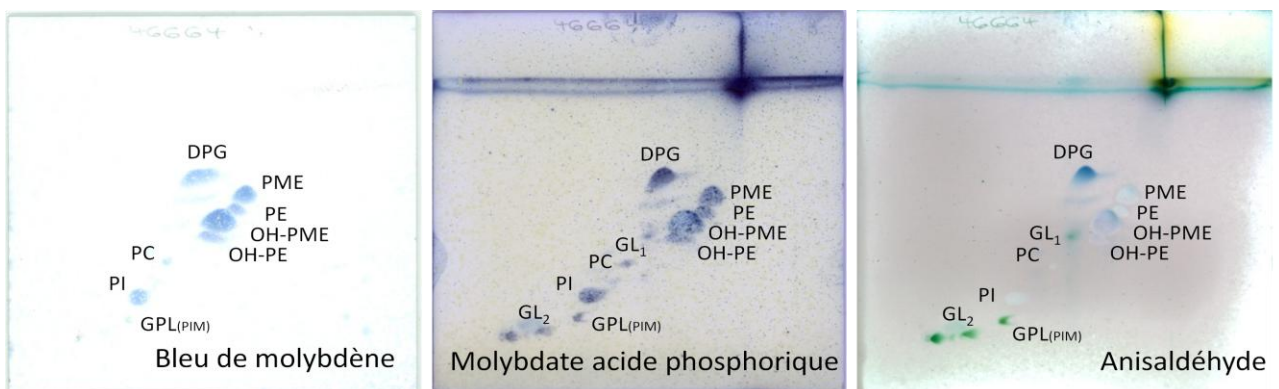
Les ménaquinones majoritaires sont MK-9(H<sub>4</sub>) pour les quatre isolats (H254 contient aussi une quantité appréciable de MK-10(H<sub>4</sub>)).

Pour les quatre isolats, la phosphatidylcholine est détectée et représente le phospholipide caractéristique (taxonomiquement important). Les autres phospholipides sont variablement présents. Des lipides inconnus (non déterminés), glycosilés ou non, sont présents aussi chez les isolats. La Figure 19 présente quelques exemples de phospholipides détectés sur plaques de CCM.

**A**



**B**



**Figure 19.** Chromatographie bi-dimensionnelle par CCM sur gel de silice des lipides polaires des isolats H195 (groupe G5) (A: en haut) et H225 (groupe G4) (B: en bas) révélés par le bleu de molybdène, le molybdate acide phosphorique et l'anisaldéhyde.

**Note:** DPG: diphosphatidylglycerol. PG: phosphatidylglycerol. PC: phosphatidylcholine. PI: phosphatidylinositol. PE : phosphatidyléthanolamine. PME: phosphatidylméthyléthanolamine. OH-PE: hydroxyPE. OH-PME: hydroxyPME. L: lipide non déterminé (1x). GL: glycolipide non déterminé (2x). GPL : glycopospholipide (= PIM = phosphoinositol mannoside).

### 3. Etude physiologique et taxonomie numérique

#### 3.1. Caractéristiques physiologiques

Les résultats des différents caractères physiologiques et biochimiques (63 tests) de l'ensemble des actinobactéries mycéliennes halophiles sont réunis dans les Tableaux 19, 20, 21, 22, et 23.

##### 3.1.1. Isolats du groupe G1

Les 16 isolats du groupe G1 (Tableau 20), proches du genre *Nocardiopsis*, ont la capacité de se développer dans une gamme de concentration en NaCl allant de 7 à 15%. Quatre isolats poussent à 0%, 10 à 20% et 20 à 25%, et aucun à 30% de NaCl. Tous les isolats poussent à pH compris entre 5 et 9 et entre 20 et 37°C et la moitié d'entre eux tolère une température allant jusqu'à 45°C. La majorité des isolats produit la nitrate réductase et peut croître en présence de lysozyme, à l'exception de H139. Tous les isolats sont sensibles à l'érythromycine et résistent à la tétracycline et l'acide nalidixique. La plupart dégrade les acides organiques tels que l'acétate, le citrate, le pyruvate et le succinate, mais aucun n'assimile le benzoate, l'oxalate, le propionate, le tartrate et le butyrate, à l'exception de H156. La plupart des isolats dégrade l'adénine, l'hypoxanthine, la guanine, la tyrosine, l'amidon, l'arbutine, la gélatine, la xanthine et le Tween 80, et la plupart ne décompose pas l'esculine. Tous les isolats ont la capacité de se développer sur des milieux contenant de la L-proline comme unique source d'azote et sont incapables de pousser en présence de la L-sérine et de L-alanine. En ce qui concerne les glucides et leurs dérivés, tous les isolats assimilent le glucose et le maltose, mais pas l'inositol, le mélézitose, le mélibiose, le raffinose, le sorbitol et le lactose. Les autres glucides sont variablement assimilés.

##### 3.1.2. Isolats du groupe G2

Les 7 isolats du groupe G2 (Tableau 21), proches du genre *Streptomonospora*, poussent entre 7 et 20% de NaCl (sauf H124 qui ne croît pas à 20%). Deux d'entre eux poussent à 25%, mais aucun à 0 et 30% de NaCl. La croissance des isolats a lieu à pH compris entre 5 et 9, et entre 20 et 37°C, mais pas à 45°C (à l'exception de H122 et H238). Sept glucides sont utilisés par tous les isolats et dix autres ne le sont pas (par tous les isolats aussi). Une variabilité est observée uniquement dans l'utilisation de l'érythritol, du fructose, du galactose, de mannose, de la salicine et du tréhalose. Tous les isolats produisent la nitrate réductase et dégradent la gélatine et la xanthine, mais pas l'adénine, la guanine, la tyrosine, la L-alanine, la L-sérine, et la plupart des acides organiques. Tous

les isolats résistent au lysozyme (sauf H124) et à l'acide nalidixique, mais sont sensibles à l'érythromycine.

### 3.1.3. Isolats du groupe G3

Les 19 isolats du groupe G3 (Tableau 22), très proches du genre *Saccharomonospora*, poussent tous entre 7 et 15% de NaCl. La plupart croît aussi à 20%, mais aucun ne pousse à 0 et à 25 et 30% de NaCl. Tous les isolats croient aussi à pH compris entre 5 et 9, et entre 20 et 37°C et, pour la plupart, à 45°C. La majorité des isolats dégrade l'amidon, la caséine, la gélatine, le Tween 80 et la tyrosine. Ils utilisent (la majorité ou tous) le cellobiose, l'érythritol, le glycérol, le glucose, le lactose, le maltose, l'acétate, le butyrate, le pyruvate et le succinate comme source de carbone, sont résistantes à la tétracycline et l'acide nalidixique, mais sensibles à l'érythromycine. La plupart ou presque la totalité des isolats n'hydrolysent pas l'adénine, l'arbutine, l'esculine, la guanine, l'hypoxanthine et la xanthine, et n'utilisent pas l'adonitol, l'arabinose, le fructose, le galactose, l'inositol, le mannitol, le mannose, le mélézitose, le mélibiose, le raffinose, le rhamnose, le ribose, le saccharose, la salicine, le sorbitol, le tréhalose, le benzoate, le citrate, l'oxalate, le propionate et le tartrate comme sources de carbone, ou encore la L-alanine, la L-proline et la L-sérine, comme sources d'azote. Beaucoup d'isolats peuvent croître en présence de lysozyme et d'acide nalidixique, et plusieurs ne produisent pas la nitrate réductase.

### 3.1.4. Isolats du groupe G4

Les 4 isolats du groupe G4 (Tableau 23), proches du genre *Prauserella*, poussent tous entre 7 et 20% de NaCl. Trois sur quatre croient aussi à 0%, mais aucun ne pousse à 25 et 30% de NaCl. Tous les isolats croient aussi à pH compris entre 5 et 9, et entre 20 et 45°C. Les quatre isolats présentent beaucoup de similitudes entre eux. En effet, ils dégradent tous le glucose, le glycérol, le mannitol, le rhamnose, l'amidon, le Tween 80, la xanthine, la L-proline, l'acétate, le butyrate, le citrate, le pyruvate et le succinate, mais aucun ne dégrade l'inositol, le mannose, le mélézitose, la salicine, le sorbitol, l'adénine, l'arbutine, la caséine, l'esculine, la guanine, l'oxalate et le tartrate. Aucun isolat ne produit de nitrate réductase et tous sont résistants à la tétracycline, l'acide nalidixique et le lysozyme. Les autres tests sont variables selon les isolats.

### 3.1.5. Isolats du groupe G5

Les 45 isolats du groupe G5 (Tableaux 24, 25 et 26) sont proches des genres *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora*. Tous les isolats de ce groupe, à l'exception de la souche H212, croient à 20% de NaCl, avec un optimum de croissance à 15% (ou parfois 20%). Aucune croissance n'a été



observée à 0% de NaCl. Certains isolats exigent plus de 10 ou parfois même 15% de NaCl pour commencer à croître. La majorité pousse à 25% de NaCl et plus de 50% croient à 30%. C'est le groupe le plus fortement halophile, ce qui correspond bien aux caractéristiques des *Actinopolyspora*, connus pour leur forte halophilie. Tous les isolats poussent entre 20 et 37°C et près de 40% d'entre eux croient à 45°C. L'intervalle de pH permettant la croissance de la plupart des isolats se situe entre 5,0 et 9,0. Le glucose et le maltose sont les sucres les plus assimilés par l'ensemble des souches étudiées. L'adonitol, le cellobiose, le fructose, le galactose, le glycérol, le mannose, le xylose, et d'autres, sont aussi assimilés par la majorité des isolats. En effet, la plupart des tests concernant une quinzaine de sucres sont positifs. Les sucres les moins utilisés sont le mélibiose et la salicine (un seul isolat), et à un degré moindre, l'inositol (5 isolats sur 45). La capacité de certaines souches à utiliser des acides organiques tels que le citrate, le pyruvate, l'acétate et parfois le butyrate a été observée. La L-alanine et la L-sérine sont peu utilisées par nos isolats, contrairement à la L-proline. La majorité des isolats dégrade la caséine, la gélatine, la tyrosine, l'amidon, l'hypoxanthine, la xanthine et le Tween 80. Plusieurs isolats résistent à l'acide nalidixique et parfois à la tétracycline et l'érythromycine et ne dégradent pas la guanine, tandis que les trois quart ne produisent pas de nitrate réductase.

Certains isolats sont pratiquement identiques entre eux physiologiquement (et aussi morphologiquement, comme c'est le cas, par exemple, de H100, H101, H102, H103, H104, H105 et H106, ce qui suggère une appartenance très probable à une seule et même espèce.

**Tableau 20.** Caractéristiques physiologiques des isolats du groupe G1.

Tests physiologiques	H139	H141	H142	H156	H159	H160	H165	H176	H178	H180	H224	H239	H240	H248	H249	H250
<b>Utilisation de:</b>																
Arabinose	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Inositol, lactose, mélézitose, mélibiose, raffinose et sorbitol.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Cellobiose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Erythritol	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Galactose	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Glucose et maltose.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
Mannitol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Rhamnose	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Ribose	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Saccharose	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Salicine	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tréhalose	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
<b>Dégradation de:</b>																
Adénine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Caséine	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Guanine	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Esculine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Arbutine	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

Suite du tableau 20.

Tests physiologiques	H139	H141	H142	H156	H159	H160	H165	H176	H178	H180	H224	H239	H240	H248	H249	H250
Amidon	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Hypoxanthine, Tween 80 et xanthine.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L-Alanine et L-sérine.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acétate	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Benzoate, oxalate, propionate et tartrate.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butyrate	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Production de nitrate réductase	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
<b>Croissance en présence de:</b>																
Tétracycline	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Acide nalidixique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythromycine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysozyme	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 0%	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
NaCl 7-15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 20%	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
NaCl 25%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
NaCl 30%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance à:</b>																
pH 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
45°C	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

**Tableau 21.** Caractéristiques physiologiques des isolats du groupe G2.

Tests physiologiques	H122	H124	H231	H232	H235	H236	H238
<b>Utilisation de:</b>							
Arabinose, cellobiose, glucose, maltose, rhamnose, ribose et xylose	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol, glycérol, inositol, lactose, mannitol, mélézitose, mélibiose, raffinose, saccharose et sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	+	+	-	+	+	+	-
Fructose	-	-	+	-	-	+	-
Galactose	+	+	+	-	+	+	+
Mannose	+	+	+	-	+	+	+
Salicine	-	-	+	-	-	-	-
Tréhalose	-	-	-	+	-	-	-
<b>Dégradation de:</b>							
Adénine, guanine et tyrosine	-	-	-	-	-	-	-
Caséine	+	-	+	-	-	-	+
Esculine	+	+	+	-	+	+	+
Arbutine	-	+	-	+	+	-	+
Amidon	+	+	-	-	+	+	-
Gélatine et xanthine	+	+	+	+	+	+	+
Hypoxanthine	-	+	-	-	-	-	-
Tween 80	+	+	+	-	+	+	+
L-Alanine, L-Serine	-	-	-	-	-	-	-
L-Proline	+	+	+	+	-	+	+
Acétate	+	+	+	-	+	+	-
Pyruvate	+	+	+	-	+	+	+
Benzoate, butyrate, citrate, propionate, succinate et tartrate	-	-	-	-	-	-	-
Oxalate	+	+	-	-	+	+	+
Production de nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

Suite du tableau 21.

Tests physiologiques	H122	H124	H231	H232	H235	H236	H238
<b>Croissance en présence de:</b>							
Tétracycline	-	-	-	+	+	+	-
Acide nalidixique	+	+	+	+	+	+	+
Erythromycine	-	-	-	-	-	-	-
Lysozyme	+	-	+	+	+	+	+
NaCl 0%	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 7-15%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 20%	+	-	+	+	+	+	+
NaCl 25%	+	-	-	-	+	-	-
NaCl 30%	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance à:</b>							
pH 5 et pH9	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	-	-	-	-	-	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

**Tableau 22.** Caractéristiques physiologiques des isolats du groupe G3.

Tests physiologiques	H126	H155	H170	H1196	H198	H203	H215	H216	H217	H218	H220	H221	H222	H223	H227	H229	H233	H234	H247
<b>Utilisation de:</b>																			
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
mélibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Raffinose et sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Erythritol	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Fructose	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Lactose	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Saccharose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Salicine, mannose mélézitose et ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tréhalose	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>Dégradation de:</b>																			
Adénine, arbutine, esculine et guanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
caséine	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

Suite du tableau 22.

Tests physiologiques	H126	H155	H170	H196	H198	H203	H215	H216	H217	H218	H220	H221	H222	H223	H227	H229	H233	H234	H247
Xanthine	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Hypoxanthine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L-Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-Serine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-Proline	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Citrate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Benzoate, oxalate et tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butyrate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionate	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Succinate	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Nitrate réductase	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<b>Croissance en présence de:</b>																			
Tétracycline	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
Acide nalidixique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythromycine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Lysozyme	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
NaCl 0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 7-15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 20%	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 25-30%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance à:</b>																			
pH 5 et pH 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

**Tableau 23.** Caractéristiques physiologiques des isolats du groupe G4.

Tests physiologiques	H137	H149	H206	H225
<b>Utilisation de:</b>				
Adonitol, arabinose, fructose, galactose, ribose et raffinose	-	+	+	+
Inositol, mannose, mélézitose, salicine et sorbitol	-	-	-	-
Cellobiose et mélibiose	-	-	+	-
Erythritol et xylose	+	+	+	-
Glucose, glycérol, mannitol et rhamnose	+	+	+	+
Lactose et maltose	+	-	+	+
Saccharose	+	+	-	+
Tréhalose	-	+	-	-
<b>Dégradation de:</b>				
Tyrosine	-	+	+	+
Adénine, arbutine, caséine, esculine, guanine et nitrate	-	-	-	-
Amidon, Tween 80 et xanthine	+	+	+	+
Hypoxanthine et gélatine	+	+	+	-
L-Alanine	+	-	-	+
L-Serine	-	-	-	+
L-Proline	+	+	+	+
Acétate, butyrate, citrate, pyruvate et succinate	+	+	+	+
Oxalate et tartrate	-	-	-	-
Benzoate	-	+	-	-
Propionate	+	-	+	-
<b>Croissance en présence de:</b>				
Tétracycline, acide nalidixique et lysozyme	+	+	+	+
Erythromycine	+	-	-	+
NaCl 0%	+	+	+	-
NaCl 7-20%	+	+	+	+
NaCl 25-30%	-	-	-	-
<b>Croissance à: pH 5, pH 9 et 45°C.</b>	+	+	+	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.



**Tableau 24.** Caractéristiques physiologiques des isolats H100 à H166 appartenant au groupe G5.

Tests physiologiques	H100	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H111	H133	H145	H147	H148	H150	H151	H152	H154	H166
<b>Utilisation de:</b>																	
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
mélibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Erythritol, glucose et maltose.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Glycérol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Salicine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mélézitose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tréhalose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<b>Dégradation de:</b>																	
Adénine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Caséine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Guanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

Suite du tableau 24.

Tests physiologiques	H100	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H111	H133	H145	H147	H148	H150	H151	H152	H154	H166
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Esculine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Arbutine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypoxanthine, xanthine et Tween 80.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
L-Sérine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Acétate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Butyrate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Oxalate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Propionate et succinate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<b>Croissance en présence de:</b>																	
Tétracycline	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Acide nalidixique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythromycine	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Lysozyme	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
NaCl 0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 7%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

Suite du tableau 24.

NaCl 15-25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 30%	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
<b>Croissance à:</b>																	
pH 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

**Tableau 25.** Caractéristiques physiologiques des isolats H167 à H212 appartenant au groupe G5.

Tests physiologiques	H167	H168	H169	H181	H182	H193	H194	H195	H197	H199	H200	H201	H202	H208	H209	H212
<b>Utilisation de:</b>																
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mélibiose et salicine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Cellobiose et fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Erythritol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Glucose et maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Lactose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Rhamnose et xylose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Mélézitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tréhalose	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<b>Dégradation de:</b>																
Adénine	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Caséine	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Guanine	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Tyrosine	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

Suite du tableau 25.

Tests physiologiques	H167	H168	H169	H181	H182	H193	H194	H195	H197	H199	H200	H201	H202	H208	H209	H212
Nitrate réductase	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Esculine	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Arbutine	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Amidon	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Xanthine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Hypoxanthine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanine	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sérine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Proline	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Acétate	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tartrate	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Oxalate	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butyrate	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Propionate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Succinate	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Croissance en présence de:</b>																
Tétracycline	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
Acide nalidixique	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Erythromycine	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Lysozyme	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
NaCl 0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 7%	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

Suite du tableau 25.

NaCl 15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
NaCl 25%	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
NaCl 30%	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<b>Croissance à:</b>																
pH 5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
pH 9	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
45°C	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

**Tableau 26.** Caractéristiques physiologiques des isolats H213 à H262 appartenant au groupe G5.

Tests physiologiques	H213	H243	H244	H245	H254	H255	H256	H257	H258	H260	H261	H262
<b>Utilisation de:</b>												
Arabinose, érythritol, glucose, glycérol, maltose et xylose.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélézitose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol et ribose.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose, fructose, galactose, mannose, rhamnose et saccharose.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Inositol, mélibiose et salicine.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tréhalose	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Dégradation de:</b>												
Adénine	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Caséine	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Guanine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyrosine	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Arbutine	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Amidon	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Xanthine et Tween 80.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypoxanthine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanine	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

**Note:** +: test positif. -: test négatif.

Suite du tableau 26.

Tests physiologiques	H213	H243	H244	H245	H254	H255	H256	H257	H258	H260	H261	H262
Serine	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Proline	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Acétate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Pyruvate	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Benzoate, oxalate et propionate.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butyrate	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Tartrate	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance en présence de:</b>												
Tétracycline	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Acide nalidixique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythromycine	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Lysozyme	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
NaCl 0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 7%	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
NaCl 15-20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 25%	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
NaCl 30%	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<b>Croissance à:</b>												
pH 5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
pH 9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
45°C	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

**Note:** +: test positif. -: test négatif.



### 3.2. Taxonomie numérique

Les résultats des tests physiologiques (63 tests par souche) sont nombreux et difficilement interprétables. Afin de montrer les ressemblances et les différences entre nos isolats nous avons exploité ces résultats par le biais d'une taxonomie numérique basée sur une classification hiérarchique ascendante en utilisant l'indice de Sokal et Michener (ISM) (ou simple matching coefficient). Nos isolats ont été regroupés dans un dendrogramme qui nous montre clairement les degrés de similarité ou de différence entre eux. Pour analyser le dendrogramme, nous avons défini des clusters à 82% de similarité. Les 91 isolats ont ainsi été scindés en 7 groupes physiologiques qu'on a appelé clusters, et qui sont numérotés de I à VII. L'analyse du dendrogramme (Figure 20) montre que les groupes, identifiés auparavant sur la base des caractéristiques morphologiques (G1 à G5), appartiennent chacun à un cluster bien défini, à l'exception du groupe 5 (qui est le plus important avec 45 isolats) qui a été subdivisé en trois clusters différents ce qui suggère l'existence éventuelle de trois genres pour ce groupe et de 7 genres au total.

#### 3.2.1. Isolats du cluster I

C'est le cluster le plus important de point de vue nombre. Il est constitué de 28 isolats provenant tous du groupe morphologique G5 lequel est proche des genres *Actinopolyspora* et des *Saccharopolyspora*. Il a été défini à un pourcentage de similitude de 82%.

#### 3.2.2. Isolats du cluster II

Ce cluster contient 4 isolats du groupe morphologique G4 qui se rapprochent macromorphologiquement et micromorphologiquement du genre *Prauserella*. Il est défini à un pourcentage de similitude de 87%.

#### 3.2.3. Isolats du cluster III

Il renferme 7 isolats appartenant au groupe morphologique G2, très proche morphologiquement du genre *Streptomonospora*. Il est défini à un pourcentage de similitude de 87%.

#### 3.2.4. Isolats du cluster IV

Il est composé de 16 isolats appartenant au groupe morphologique G1 qui semble appartenir au genre *Nocardiosis*. Il est défini à un pourcentage de similitude de 86%.

### 3.2.5. Isolats du cluster V

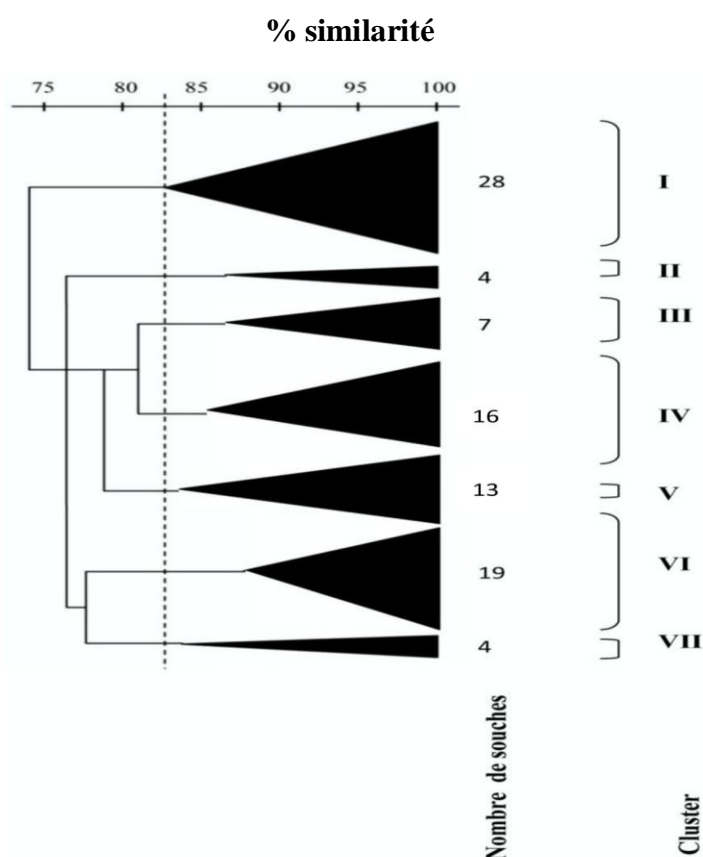
Ce cluster comprend 13 isolats appartenant au groupe morphologique G5 (proches de *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora*). Ces isolats se ressemblent physiologiquement à 84%.

### 3.2.6. Isolats du cluster VI

Il renferme 19 isolats appartenant au groupe morphologique G3, qui, d'après la micromorphologie, appartient vraisemblablement au genre *Saccharomonospora*. Il est défini à un pourcentage de similitude de 88%.

### 3.2.7. Isolats du cluster VII

Ce cluster est constitué par 4 isolats du groupe G5 (groupe morphologiquement proche des *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora*). Il est défini à un pourcentage de similitude de 83%.



**Figure 20.** Dendrogramme issu de l'analyse UPGMA de 63 caractères physiologiques montrant la relation entre elles des 91 souches d'actinobactéries mycéliennes halophiles isolées des sols sahariens.

**Note:** UPGMA = Unweighted Pair-Group Method using the Arithmetic Average (méthode des groupes paires non pondérés utilisant la moyenne arithmétique).

#### 4. Discussion

L'identification des actinobactéries repose sur les caractéristiques morphologiques (macro et micromorphologiques), chimiques (analyses des constituants cellulaires en acides aminés, sucres, et lipides) et moléculaires (études phylogénétiques basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S et l'hybridation ADN-ADN) (Goodfellow *et al.*, 2012). Certains genres (*Streptomyces*, *Saccharomonospora*, *Streptomonospora*, *Nocardiopsis*, etc.) sont pourtant facilement reconnaissables par leur morphologie très caractéristique (Cui, 2012; Hozzein et Trujillo, 2012; Kämpfer, 2012; Kim, 2012) et une étude chimique portant uniquement sur la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique, ainsi que la présence (ou non) de glycine et de sucres suffit à leur identification, ne serait-ce que dans un cadre global (car la détermination de nouveaux taxons nécessite une étude polyphasique complète). D'autres genres, comme ceux appartenant par exemple au groupe des nocardioformes (*Nocardia*, *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Prauserella*, etc.), sont plus difficiles à déterminer, même si l'halophilie des représentants des *Actinopolyspora* et des *Prauserella* aide à leur identification (Kim et Goodfellow, 2012a; Trujillo et Goodfellow, 2012). De plus, le regroupement des isolats après une taxonomie numérique basée sur une étude physiologique permet d'avoir une idée sur le nombre de genres et éventuellement d'espèces.

Dans une première partie de notre travail sur la taxonomie des actinobactéries mycéliennes halophiles, nous avons étudié les caractéristiques de 91 isolats sur la base de leur morphologie (macro et micromorphologie), de la composition chimique de leurs constituants cellulaires (DAP, glycine, sucres et pour certains, phospholipides, ménaquinones et acides gras) et de leur physiologie (avec taxonomie numérique basée sur 63 tests physiologiques) (Saker *et al.*, 2015a).

Ainsi, les isolats du groupe morphologique G1 forme un groupe homogène du point de vue des caractéristiques macro et microscopiques qui sont celles du genre *Nocardiopsis* (Meyer, 1976), à savoir, un mycélium aérien (MA) modérément ramifiés et flexueux, se fragmentant entièrement en "zig-zag" en de longues chaînes de spores en bâtonnets non mobiles et un mycélium du substrat (MS) qui se fragmente. De plus, tous les isolats possèdent l'isomère DL de l'acide diaminopimélique (DAP), mais pas de glycine, et des sucres non caractéristiques qui sont surtout le ribose, le glucose et le galactose. Ceci permet de les classer dans le chimiotype IIIC selon Lechevalier et Lechevalier (1970). Ces caractéristiques chimiques correspondent également bien à ceux du genre *Nocardiopsis*. La taxonomie numérique a permis de regrouper les 16 isolats dans un même cluster physiologique (cluster I) signifiant que l'on est en présence d'un seul genre, mais probablement de plusieurs espèces, vu l'hétérogénéité physiologique constatée au sein de ce cluster. Le genre *Nocardiopsis*

ressemble beaucoup morphologiquement au genre *Saccharothrix* (Labeda, 2012), mais diffère par le chimiotype (III E pour *Saccharothrix* avec présence de rhamnose comme sucre caractéristique) et par leur sensibilité au NaCl (les *Saccharothrix* sont très sensibles au NaCl, contrairement aux espèces de *Nocardiopsis* qui sont toutes résistantes et dont plusieurs sont halophiles) (Hozzein et Trujillo, 2012). Les 16 isolats du groupe G1 peuvent donc, sous réserve des analyses moléculaires, être classés provisoirement dans le genre *Nocardiopsis* (Meyer, 1976).

Les sept isolats du groupe morphologique G2 ont également une micromorphologie très caractéristique. Les caractéristiques de leur MA sont les mêmes que ceux du groupe G1, mais ils diffèrent par la production de spores isolées sur le MS. Seul le genre *Streptomonospora* (Cui *et al.*, 2001) possède ces caractéristiques. De plus, toutes les espèces de ce genre sont halophiles et toutes possèdent le chimiotype III C, comme nos isolats (Cui, 2012). La taxonomie numérique a regroupé les isolats dans un seul cluster, donc probablement un seul genre, avec cependant la possibilité de plus d'une espèce (vu l'hétérogénéité physiologique). Les sept isolats du groupe G2 appartiennent donc vraisemblablement au genre *Streptomonospora*, sous réserve de l'analyse phylogénétique qui sera réalisée ultérieurement.

Les 19 isolats du groupe G3 sont également très caractéristiques avec leur MA produisant de manière alternée des spores sessiles, isolées ou en paires. De plus, ils possèdent le chimiotype IVA (Lechevalier et Lechevalier, 1970), c'est-à-dire, la présence de DL DAP sans glycine, et la présence d'arabinose et de galactose comme sucres taxonomiquement importants. Ces caractéristiques correspondent très bien à celles du genre *Saccharomonospora* (Nonomura et Ohara, 1971; Kim, 2012). La taxonomie numérique a regroupé les 19 isolats dans un seul cluster, ce qui confirme que l'on est en présence d'un seul genre, mais probablement de plusieurs espèces au vu de l'hétérogénéité physiologique observée. L'appartenance des isolats au genre *Saccharomonospora* doit cependant être confirmée par les études phylogénétiques.

Les quatre isolats du groupe G4, morphologiquement identiques entre eux, présentent un aspect rappelant celui des nocardioformes, telles que *Nocardia* et *Prauserella* par exemple, à savoir un MA qui se fragmente en spores, un MS excessivement fragmenté et également un chimiotype IVA (DL DAP sans glycine mais avec arabinose et galactose). Cependant, le fait que ces isolats soient halophiles laisse penser qu'on est en présence du genre *Prauserella*, connu pour cette caractéristique (Kim et Goodfellow, 2012a). De plus, l'analyse des phospholipides, des acides gras et des ménaquinones d'un des quatre isolats (H225) plaide en faveur de leur appartenance au genre *Prauserella* (Kim et Goodfellow, 2012a). La taxonomie numérique les a regroupés dans un seul

cluster (donc apparemment un seul genre). Ces isolats sont physiologiquement assez proches entre eux et sont caractérisés par 33 tests identiques, d'où la possibilité d'avoir une seule ou deux espèces différentes uniquement. Sous réserve donc des analyses phylogénétiques, les quatre isolats du groupe G4 peuvent être classés dans le genre *Prauserella*.

En ce qui concernent les 45 isolats du groupe G5, les résultats des tests physiologiques, et notamment la taxonomie numérique, ont permis de séparer ce groupe morphologique hétérogène en trois clusters (cluster I avec 28 isolats, cluster V avec 13 isolats et cluster VII avec 4 isolats) correspondant probablement à trois genres différents. Ces isolats ont un MA qui produit des chaînes de spores non mobiles, en bâtonnets, ovoïdes ou parfois arrondies. Le MS se fragmente en éléments coccoïdes ou en bâtonnets. Ces isolats ont le chimiotype IVA (DL-DAP sans glycine, arabinose et galactose, comme sucres caractéristiques). Les genres qui ont ces caractéristiques et sont halophiles ou halotolérants au sel sont *Actinopolyspora* (toutes les espèces sont halophiles) (Trujillo et Goodfellow, 2012), *Saccharopolyspora* (Kim et Goodfellow, 2012b) et parfois *Amycolatopsis* (certaines espèces sont halophiles ou halotolérantes) (Tan et Goodfellow; 2012). L'analyse des phospholipides, des acides gras et des ménaquinones de trois isolats de ce groupe (H254 du cluster I et H150 et H195 du cluster VII) confirme les résultats obtenus précédemment. Cependant, du point de vue micromorphologique, nos isolats se rapprochent uniquement d'*Actinopolyspora* et de *Saccharopolyspora*. Nous remarquons aussi qu'il existe une certaine hétérogénéité dans la physiologie des isolats des trois clusters laissant penser à la possibilité d'avoir plusieurs espèces. Seule une étude phylogénétique nous permettra de confirmer l'appartenance des 45 isolats à ces deux genres et aussi de connaître le troisième genre obtenu par la taxonomie numérique.

## 5. Conclusion

Les travaux de recherche entrepris dans cette partie de la thèse ont été orientés vers la caractérisation phénotypique (morphologie et physiologie) et chimique (chimiotaxonomie) des 91 isolats.

Les études morphologiques ont permis de rapprocher les isolats des genres *Nocardiopsis*, *Streptomonospora*, *Saccharomonospora*, *Prauserella*, *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora*.

Les études chimiques ont conforté les résultats morphologiques sur l'appartenance de nos isolats à ces six genres.

La taxonomie numérique, basée sur les études physiologiques, a permis de détecter non seulement six, mais sept genres.

Cependant, malgré toutes ces informations, seules les études phylogénétiques basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S nous permettront de statuer définitivement sur l'appartenance de nos 91 isolats à des genres précis et de les rapprocher des espèces existantes. Ces travaux sont présentés dans la prochaine partie.

### III. ETUDES PHYLOGENETIQUES ET IDENTIFICATION DES GENRES ET DES ESPECES

#### 1. Etudes phylogénétiques

Sur un total de 91 actinobactéries, 60 souches appartenant à différents clusters (groupes physiologiques) et aussi différents groupes morphologiques ont été soumises à une analyse moléculaire sur la base du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. De nombreux représentants de tous les clusters ont été sélectionnés (sauf pour le cluster VII et II où toutes les souches ont été retenues). Nous avons ainsi éliminé beaucoup de souches qui provenaient d'un même échantillon de sol et qui étaient pratiquement identiques entre elles du point de vue morphologique et physiologique. Par exemple, parmi les souches H100, H101, H102, H103, H104, H105 et H106, provenant toutes de l'échantillon BG1 de Boughezoul, et qui étaient identiques entre elles phénotypiquement (à part une légère différence pour H106), nous n'avons retenu que deux: H100 et H106. Les séquences obtenues du gène codant pour l'ARNr 16S ont été déposées dans la GenBank sous les numéros d'accèsion de KJ574145–KJ574163, KJ574165–KJ574179, KJ574181–KJ574187, KJ574189– KJ574192, KJ574192–KJ574203, KJ504173, KJ504178 et KJ504174. Ces séquences ont été alignées et comparées avec les séquences des espèces-types des bactéries contenues dans la base de données génomique «Ez Taxon-e». Ce qui est intéressant à souligner, c'est la similitude parfaite entre, d'une part, les analyses phénotypiques (études morphologiques et clusters physiologiques obtenus par la taxonomie numérique) et chimiotaxonomique, et d'autre part, les analyses phylogénétiques. Les sept genres proposés pour les clusters I à VII (six genres déterminés et un genre non déterminé) ont tous été confirmés par les analyses phylogénétiques, à savoir: *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Prauserella*, *Streptomonospora*, *Nocardiopsis* et un genre indéterminé.

### 1.1. Clusters III et IV

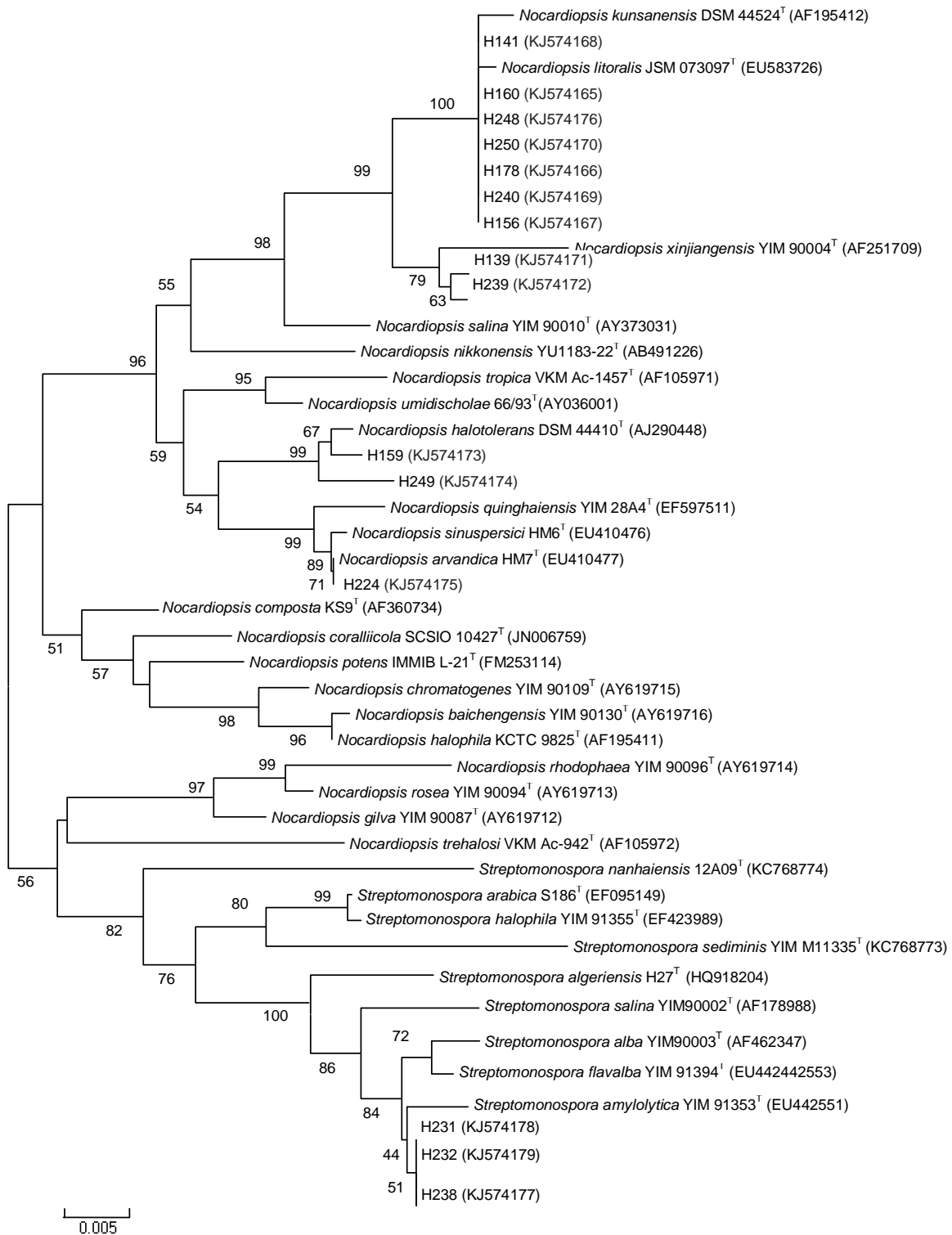
Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a permis de confirmer que les souches du cluster III et celles du cluster IV appartiennent bien aux genres *Streptomonospora* et *Nocardiopsis* respectivement (Tableaux 27 et 28).

Trois souches (H231, H232 et H238) représentatives du cluster III ont fait l'objet d'une analyse moléculaire. L'alignement des séquences obtenues par le blast a permis de rattacher ce cluster au genre *Streptomonospora*. Les trois souches sont très proches entre elles (99,8 à 99,9% de similarité) et pourraient peut être appartenir à une même espèce. Les souches H231 et H238 se rapprochent de l'espèce *St. alba* (99,5% de similarité) et la souche H232, de *St. amylolytica* (99,4% de similarité) (Tableau 26). Malgré ces pourcentages relativement élevés, l'arbre phylogénétique (Figure 21) montre que les souches H231, H232 et H238 se détachent des espèces du genre *Streptomonospora* et pourraient appartenir à une nouvelle espèce qu'il faudra confirmer par le test d'hybridation ADN-ADN.

**Tableau 27.** Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des isolats H231, H232 et H238 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomonospora*.

Espèce	Souche-type (n° d'accension)	Numéro de la séquence	% de similarité avec les souches:		
			H231	H232	H238
<i>Streptomonospora alba</i>	YIM 90003 <sup>T</sup>	AF462347	99,3	99,5*	99,3
<i>St. flavalba</i>	YIM 91394 <sup>T</sup>	EU442553	99,3	99,3	99,3
<i>St. amylolytica</i>	YIM 91353 <sup>T</sup>	EU442551	99,4*	99,4	99,4*
<i>St. salina</i>	YIM 90002 <sup>T</sup>	AF178988	98,6	98,8	98,6

**Note:** \* = pourcentage de similarité le plus élevé.



**Figure 21.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S et montrant les relations des souches des clusters III et IV et les souches-types des espèces les plus proches des genres *Nocardioopsis* et *Streptomonospora*.

**Note:** Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentage de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,005 substitution par position de nucléotide.



Douze souches représentatives du cluster IV ont été étudiées du point de vue moléculaire. Cette étude a confirmé la filiation de ces souches au genre *Nocardiopsis*. Les souches H141, H156, H160, H178, H240, H248 et H250 sont pratiquement identiques à *N. kunsanensis* (avec un taux de similarité de 100% ) et très proches de *N. litoralis* (99,8 à 99,9%). Les souches H139 et H239 se rapprochent un peu de *N. xinjiangensis*, mais avec un taux de similarité moins élevé (99,4 à 99,5% de similarité). La souche H159 est reliée à *N. halotolerans* (99,9% de similarité) alors que la souche H249 s'en distingue (99,5% uniquement). Enfin l'isolat H224 s'est révélé être identique à *N. arvandica*, avec 100% de similarité (Tableau 27, Figure 20). L'arbre phylogénétique montre que les distances entre les souches H139, H239 et H249 et les espèces les plus proches sont semblables ou parfois moindres à celles obtenues entre quelques espèces valides de ce genre, ce qui suggère la possibilité d'avoir de nouvelles espèces sous réserve de faire le test d'hybridation ADN-ADN.

## 1.2. Clusters II et VI

L'étude moléculaire a permis de rattacher les souches des clusters VI et II respectivement aux genres *Saccharomonospora* et *Prauserella* (Tableaux 29, 30).

Seize souches représentatives du cluster VI (qui en comptait 19) ont fait l'objet d'une étude phylogénétique. L'alignement de leurs séquences par le blast a montré des pourcentages de similarités de 99,4 à 99,7% (à l'exception de la souche H220) avec l'espèce la plus proche, *Saccharomonospora paurometabolica*. La souche H220 s'est révélée être identique à *Sm. saliphila* (100% de similarité). L'analyse phylogénétique (Figure 22) montre la position taxonomique de l'isolat H234 qui se détache des espèces les plus proches du genre *Saccharomonospora*.

Les quatre souches du cluster II (H137, H149, H225 et H206) ont été retenues pour l'étude phylogénétique. Leurs séquences ont été alignées avec les séquences des espèces du genre *Prauserella*. La souche H206 est très proche de *P. aidingensis* (99,9% de similarité) et H139 est proche de *P. alba* (99,8%). En revanche, la souche H137 et encore plus la souche H225 ont montré des taux de similarité relativement bas, qui sont respectivement de 99,4% et 98,9% avec *P. flava*. La Figure 22 montre la position taxonomique des quatre souches. Au vu des pourcentages de similarité assez bas, les souches H225, et à un degré moindre H137, peuvent représenter de nouvelles espèces sous réserve de l'hybridation ADN-ADN.

**Tableau 28.** Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches représentatives du cluster IV avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Nocardiosis*.

Espèce	Souche-type (n° d'accèsion)	Numéro de la séquence	% de similarité avec les souches:											
			H139	H141	H156	H159	H160	H178	H224	H239	H240	H248	H249	H250
<i>Nocardiosis kunsanensis</i>	HA-9 <sup>T</sup>	AF195412	98,8	<b>100*</b>	<b>100*</b>	96,9	<b>100*</b>	<b>100*</b>	97,1	98,9	<b>100*</b>	<b>100*</b>	96,9	<b>100*</b>
<i>N. litoralis</i>	JSM 073097 <sup>T</sup>	EU583725	98,7	99,9	99,9	98,8	99,9	99,9	96,9	98,7	99,9	99,9	96,8	99,9
<i>N. xinjiangensis</i>	YIM 90004 <sup>T</sup>	AF251709	<b>99,4*</b>	98,8	98,6	96,9	98,8	98,8	97,1	<b>99,6*</b>	98,8	98,8	96,9	99,0
<i>N. salina</i>	YIM 90010 <sup>T</sup>	AY373031	98,3	98,1	97,7	97,6	98,1	98,1	97,3	98,2	98,1	98,1	97,3	98,0
<i>N. aegyptia</i>	DSM 44442 <sup>T</sup>	AJ539401	96,9	97,3	97,1	97,5	97,3	97,3	98,6	96,9	97,3	97,3	97,4	97,6
<i>N. nikkonensis</i>	YU1183-22 <sup>T</sup>	AB491225	97,6	97,7	97,6	97,8	97,7	97,7	97,3	97,6	97,7	97,7	97,6	97,7
<i>N. arvandica</i>	HM7 <sup>T</sup>	EU410477	96,6	97,1	96,9	97,9	96,8	97,1	<b>100*</b>	97,1	96,8	97,1	97,9	97,1
<i>N. sinuspersici</i>	HM6 <sup>T</sup>	EU41076	96,6	97,0	96,8	97,9	96,7	97,0	99,9	97,0	96,7	97,0	97,9	97,0
<i>N. halotolerans</i>	DSM 44410 <sup>T</sup>	AJ290448	96,9	97,0	96,8	<b>99,9*</b>	97,0	97,0	98,3	96,9	97,0	97,0	<b>99,5*</b>	96,8

**Note:** \* = pourcentage de similarité le plus élevé.

**Tableau 29.** Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches du cluster VI avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Saccharomonospora*.

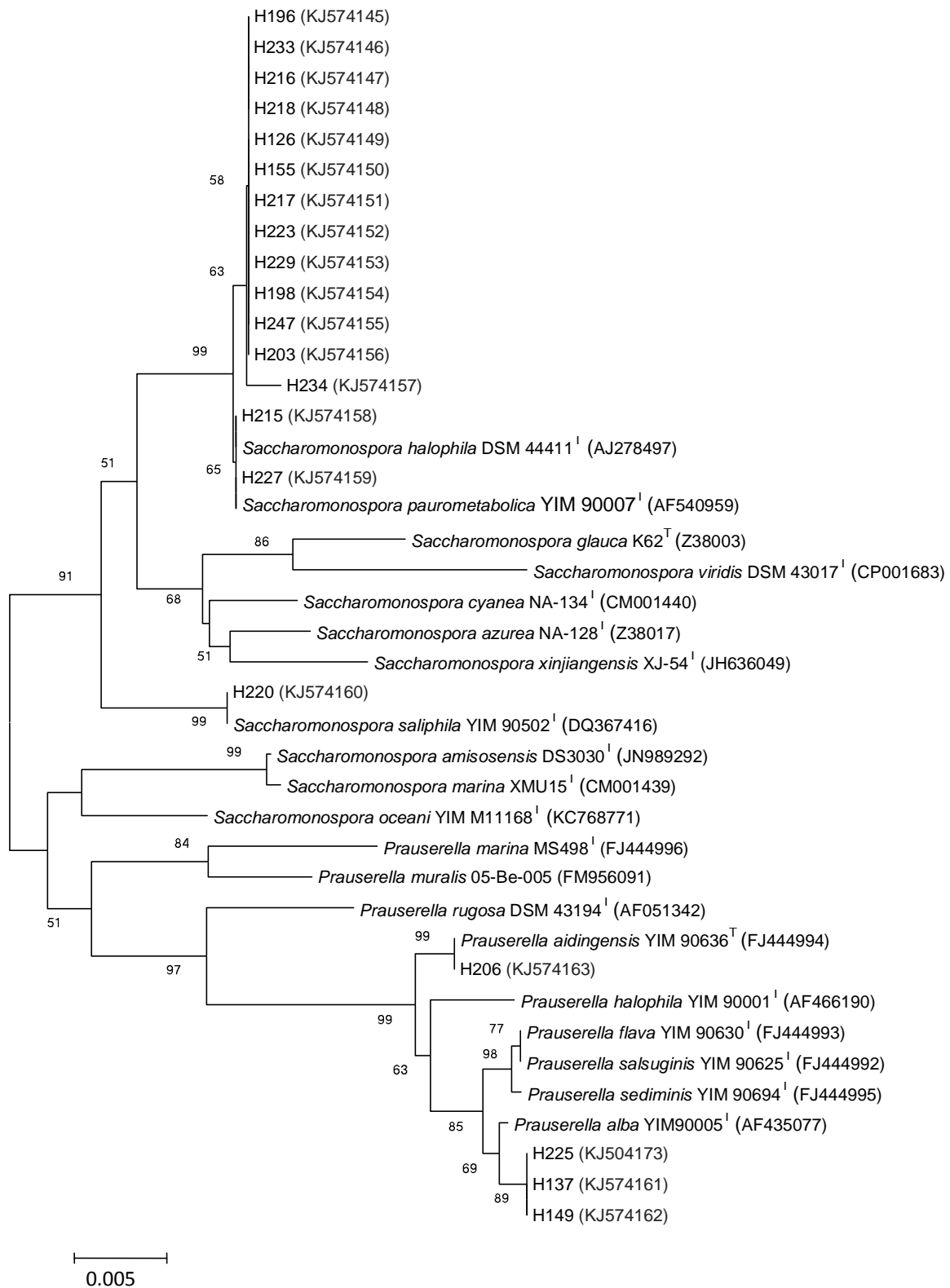
Espèce	Souche-type (n° d'accension)	Numéro de la séquence	% de similarité avec les souches:															
			H126	H155	H196	H198	H203	H215	H216	H217	H218	H220	H223	H227	H229	H233	H234	H247
<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	YIM 90007 <sup>T</sup>	AF540959	99,6*	99,6*	99,6*	99,6*	99,6*	99,6*	99,4*	99,7*	99,5*	97,1	99,7*	99,6*	99,5*	99,6*	99,4*	99,6*
<i>Sm. halophila</i>	DSM 44411 <sup>T</sup>	AJ278497	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,4	99,2	99,4	99,2	96,8	99,4	99,3	99,2	99,2	99,1	99,2
<i>Sm. oceani</i>	YIM M11168 <sup>T</sup>	KC768771	97,0	96,9	96,9	96,9	96,7	96,8	97,1	96,7	97,1	96,2	96,8	96,8	96,9	96,8	96,7	96,8
<i>Sm. cyanea</i>	NA 134 <sup>T</sup>	Z38018	96,8	96,8	96,6	96,9	96,7	97,0	97,0	96,8	96,9	96,8	96,8	97,1	96,7	96,7	96,7	96,8
<i>Sm. saliphila</i>	YIM 90502 <sup>T</sup>	DQ367416	96,8	96,9	97,0	96,8	96,8	97,4	97,0	96,9	96,9	100*	96,9	97,3	96,8	96,8	96,7	96,8
<i>Sm. azurea</i>	NA 128 <sup>T</sup>	Z38017	96,9	96,8	96,6	97,0	96,8	97,0	96,9	97,0	97,0	97,3	97,0	97,0	97,0	96,9	96,9	96,9

**Note:** \* = pourcentage de similarité le plus élevé.

**Tableau 30.** Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches H137, H149, H206 et H225 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Prauserella*.

Espèce	Souche-type (n° d'accension)	Numéro de la séquence	% de similarité avec les souches:			
			H137	H149	H206	H225
<i>Prauserella flava</i>	YIM 90630 <sup>T</sup>	FJ444993	99,4*	99,7	98,7	98,9*
<i>P. alba</i>	YIM 90005 <sup>T</sup>	AT435077	99,2	99,8*	98,9	98,8
<i>P. salsuginis</i>	YIM 90625 <sup>T</sup>	FJ444992	99,1	99,7	98,4	98,6
<i>P. sediminis</i>	YIM 90694 <sup>T</sup>	FJ444995	98,8	99,7	98,2	98,4
<i>P. aidingensis</i>	YIM 90636 <sup>T</sup>	FJ444994	99,1	99,33	99,9*	98,5
<i>P. halophila</i>	YIM 90001 <sup>T</sup>	AF466190	98,4	99,33	98,6	97,8

**Note:** \* = pourcentage de similarité le plus élevé.



**Figure 22.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S et montrant les relations entre les souches des clusters II et VI et les souches-types des espèces les plus proches des genres *Saccharomonospora* et *Prauserella*.

**Note:** Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentage de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,005 substitution par position de nucléotide.

### 1.3. Clusters I, V et VII

L'étude moléculaire a permis de confirmer le rattachement des souches des cluster I et V aux genres *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora* et de constater que les souches du cluster VII appartiennent effectivement à un genre non connu, qui est donc original.

#### 1.3.1. Souches du cluster I

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a été effectué pour 15 souches représentatives du cluster I. L'alignement des séquences obtenues par le blast a confirmé leur appartenance au genre *Actinopolyspora* (Tableau 31). La souche H202 est proche de l'espèce *A. mzabensis* (99,4% de similarité). Les souches H255, H258, H260 et H261 présentent un pourcentage de similarité de 99,2% avec *A. erythraea*, et les souches H100 et H106, de 99,3 à 99,5% avec *A. xinjiangensis*. Les souches H133, H147, H148, H181, H197, H243 et H244 se rapprochent beaucoup de *A. saharensis* avec un taux de similarité allant de 99,4% à 99,8%. En revanche, la souche H254 est relativement éloignée de *A. saharensis* (uniquement 99,0%) et encore plus des autres espèces d'*Actinopolyspora*.

L'analyse phylogénétique (Figure 23) montre la position taxonomique de nos souches dont quelques unes se détachent légèrement des espèces valides du genre *Actinopolyspora*, ce qui nécessite un test d'hybridation ADN-ADN pour statuer définitivement sur leur position taxonomique.

#### 1.3.2. Souches du cluster V

La comparaison des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des 6 souches représentatives du cluster V avec celles des espèces connues les plus proches de *Saccharopolyspora* a donné des pourcentages de similarité allant de 99,4% à 99,9% avec *S. halophila* (souches H154, H167, H208, H212 et H213), les plus basses valeurs étant obtenues pour H154 et H208 (99,4%). Quant à la souche H145, elle présente 99,6% de similarité avec *S. lacisalsi* (Tableau 32). Ce résultat confirme ainsi l'appartenance de ces souches au genre *Saccharopolyspora*. La Figure 23 montre l'arbre phylogénétique indiquant la position taxonomique de nos souches par rapport aux autres espèces les plus proches du même genre.

#### 1.3.3. Souches du cluster VII : phylogénie, signatures des nucléotides et pourcentage de GC

Le cluster VII renferme quatre souches (H150, H151, H195 et H199) qui se distinguent physiologiquement de l'ensemble de nos autres souches halophiles. Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a été effectué pour les quatre souches de ce cluster. Le test du blast a permis de distinguer de manière très nette nos souches des genres voisins, à savoir les genres *Actinopolyspora*

et *Saccharopolyspora*, avec des pourcentages de similarité très faibles: uniquement 90,00 à 92,2% (Tableau 33). Ce pourcentage est encore plus bas vis-à-vis des autres genres. Les quatre souches forment une lignée très distincte dans l'arbre phylogénétique; elles se détachent nettement des espèces des genres les plus proches (Figure 23), ce qui montre donc que l'on est en présence d'un nouveau genre qu'on a nommé pour la circonstance *Mzabimyces* (souches originaires des sols de la région du M'zab).

Plus que ça, nos quatre souches, qui au vu de l'arbre phylogénétique pourraient appartenir à une ou deux espèces, se positionnent entre les souches appartenant à deux familles distinctes, celles des *Actinopolysporaceae* (qui comporte *Actinopolyspora* comme unique genre) et celle des *Pseudonocardiaceae* (qui comporte le genre *Saccharopolyspora* et également d'autres genres encore plus éloignés de nos souches). Ceci suggère donc fortement que nos souches appartiennent à un nouveau genre faisant lui-même partie d'une nouvelle famille.

La délimitation des familles est basée sur les signatures des nucléotides (à des positions précises) du gène codant pour l'ARN 16S, ces signatures étant répertoriées dans le Manuel de Bergey de 2012 et dans d'autres ouvrages. Nous avons donc comparé les signatures des nucléotides de nos quatre souches avec celles des genres des familles des *Pseudonocardiaceae* et des *Actinopolysporaceae*, de manière à voir si nos souches appartiennent à l'une des deux familles ou si elles appartiennent à une famille nouvelle. Le Tableau 34 montre clairement que nos quatre souches possèdent des signatures différentes des deux familles à des positions précises des nucléotides dans les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, notamment les positions 127:234, 282:284, 480, 564, 657:749, 672:734, 840:846, 986:1219, 1100, 117:1183 et 1309:1328.

Ceci montre donc que les souches H195, H150, H151 et H199 de *Mzabimyces* appartiennent donc à une nouvelle famille que l'on a nommée *Mzabimycetaceae*.

La détermination des pourcentages de guanine-cytosine, effectuée pour trois des quatre souches, a montré qu'ils sont de 68,2 mol% pour les souches H195 et H150 et 68,3 mol% pour la souche H151.

Une hybridation ADN-ADN est nécessaire pour savoir si les quatre souches appartiennent à une seule espèce ou peut être à deux espèces comme le suggère l'arbre phylogénétique (les souches H195 et H150 se détachent légèrement des souches H151 et H199).

**Tableau 31.** Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches représentatives du cluster I avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Actinopolyspora*.

Espèce	Souche-type (n° d'accèsion)	Numéro de la séquence	% de similarité avec les souches:														
			H100	H106	H133	H147	H148	H181	H197	H202	H243	H244	H254	H255	H258	H260	H261
<i>Actinopolyspora saharensis</i>	DSM 45459 <sup>T</sup>	HQ918198	96,6	95,8	<b>99,4*</b>	<b>99,8*</b>	<b>99,8*</b>	<b>99,6*</b>	<b>99,5*</b>	99,3	<b>99,6*</b>	<b>99,6*</b>	<b>99,0*</b>	95,9	95,9	95,9	95,9
<i>A. algeriensis</i>	DSM 45476 <sup>T</sup>	HQ918195	96,2	95,2	98,4	98,9	98,7	98,5	98,4	97,5	98,9	98,8	98,9	95,6	95,6	95,6	95,6
<i>A. halophila</i>	ATCC 27976 <sup>T</sup>	X54287	96,5	95,7	98,8	99,3	99,0	98,8	98,8	97,5	99,3	98,8	98,9	95,6	95,7	95,7	95,7
<i>A. mortivallis</i>	DSM 44261 <sup>T</sup>	DQ883812	95,4	95,1	97,7	97,5	96,5	97,3	96,6	96,3	97,5	97,1	96,7	94,7	94,7	94,7	94,7
<i>A. erythraea</i>	YIM 90600 <sup>T</sup>	GQ480939	98,0	97,9	95,9	96,9	96,8	96,5	96,5	98,2	96,8	96,5	96,5	<b>99,2*</b>	<b>99,2*</b>	<b>99,2*</b>	<b>99,2*</b>
<i>A. alba</i>	YIM 90480 <sup>T</sup>	GQ480940	98,1	98,4	95,7	96,7	96,6	96,4	96,2	98,0	96,6	96,2	96,5	97,0	97,0	97,0	97,0
<i>A. xinjiangensis</i>	TRM 40136 <sup>T</sup>	GU479394	<b>99,5*</b>	<b>99,3*</b>	95,4	96,2	95,8	95,7	95,0	97,8	95,9	95,6	96,3	98,8	98,8	98,8	98,8
<i>A. dayingensis</i>	TRM 4064 <sup>T</sup>	KC461229	94,4	93,1	97,5	97,4	96,9	97,2	96,7	96,4	97,5	97,0	97,0	93,6	93,6	93,6	93,6
<i>A. mzabensis</i>	DSM 45460 <sup>T</sup>	HQ918202	97,8	96,9	95,1	96,8	96,5	96,2	95,4	<b>99,4*</b>	96,5	96,2	96,6	97,4	97,4	97,4	97,4
<i>A. lacussalsi</i>	TRM 40139 <sup>T</sup>	JX485633	98,1	98,1	95,8	96,4	90,0	96,0	95,8	98,5	96,0	95,9	95,9	97,3	97,3	97,3	97,3
<i>A. righensis</i>	DSM 45501 <sup>T</sup>	HQ919196	98,0	98,1	95,8	96,1	96,2	96,2	96,1	98,0	95,9	96,1	95,9	98,0	98,0	98,0	96,0

**Note:** \* = pourcentage de similarité le plus élevé.

**Tableau 32.** Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches représentatives du cluster V avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Saccharopolyspora*.

Espèce	Souche-type (n° d'accèsion)	Numéro de la séquence	% de similarité avec les souches:					
			H145	H154	H167	H208	H212	H213
<i>Saccharopolyspora lacisalsi</i>	TRM 40133 <sup>T</sup>	JF411070	<b>99,6*</b>	95,6	95,5	96,0	96,0	95,9
<i>S. qijiaojiangensis</i>	YIM 91168 <sup>T</sup>	EF687715	95,9	95,6	95,7	95,8	96,3	95,8
<i>S. flava</i>	JCM 10665 <sup>T</sup>	AF154128	94,2	96,5	96,4	97,1	96,6	97,2
<i>S. halophila</i>	YIM 90500 <sup>T</sup>	DQ923139	95,4	<b>99,4*</b>	<b>99,6*</b>	<b>99,4*</b>	<b>99,9*</b>	<b>99,8*</b>
<i>S. reactivirgula</i>	ATTC 33515 <sup>T</sup>	X53194	95,1	95,5	95,5	95,7	95,3	95,7
<i>S. cebuensis</i>	DSM 45019 <sup>T</sup>	EF030715	95,3	96,7	95,6	96,7	97,8	97,1
<i>S. cavernae</i>	YIM C01235 <sup>T</sup>	KF177334	96,1	96,2	96,4	96,3	97,0	96,6
<i>S. pathumthaniensis</i>	NBRC 104112 <sup>T</sup>	HM067865	93,6	96,5	96,6	96,6	97,2	96,9
<i>S. dendranthemae</i>	KCTC 19889 <sup>T</sup>	JQ819260	93,9	96,9	97,0	96,8	97,7	97,2
<i>S. tripterygii</i>	YIM 65359 <sup>T</sup>	FJ214364	93,7	96,6	96,7	96,9	97,2	96,9
<i>S. endophytica</i>	YIM 61095 <sup>T</sup>	EU814512	93,3	96,4	96,5	96,3	97,2	96,7

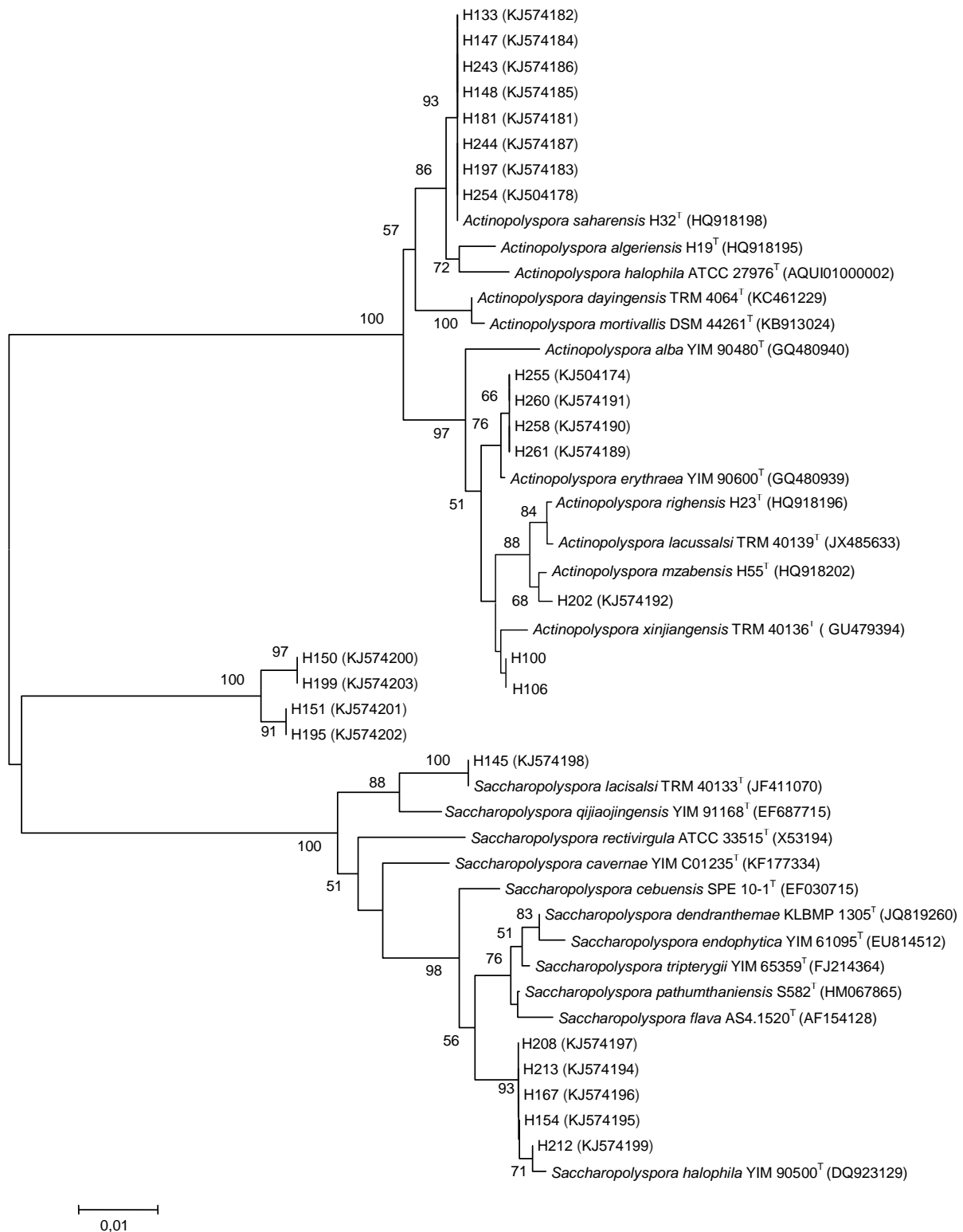
**Note:** \* = pourcentage de similarité le plus élevé.



**Tableau 33.** Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches H150, H151, H195 et H199 avec les souches-types des genres et des espèces les plus proches.

Espèce	Souche-type (n° d'accession)	Numéro de la séquence	% de similarité avec les souches:			
			H150	H151	H195	H199
<i>Saccharopolyspora lacisalsi</i>	TRM 40133 <sup>T</sup>	JF411070	<b>92,2*</b>	<b>91,6*</b>	91,7	<b>91,4*</b>
<i>S. qijiaojiangensis</i>	YIM 91168 <sup>T</sup>	EF687715	91,8	91,6	<b>92,0*</b>	91,2
<i>S. rosea</i>	IMMIB L-1070 <sup>T</sup>	AM992060	91,7	91,4	91,3	91,0
<i>S. gloriosae</i>	YIM 60513 <sup>T</sup>	EU005371	91,2	91,0	91,2	90,6
<i>S. halophila</i>	YIM 90500 <sup>T</sup>	DQ923139	90,5	90,6	90,3	90,6
<i>Actinopolyspora xinjiangensis</i>	TRM 40136 <sup>T</sup>	GU479394	91,1	90,2	90,7	90,0

**Note:** \* = pourcentage de similarité le plus élevé.



**Figure 23.** Arbre phylogénétique basé sur l’analyse des séquences du gène codant pour l’ARNr 16S et montrant les relations entre les souches H195, H199, H150 et H151 avec les espèces-types des genres les plus proches, *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora*.

**Note:** Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentage de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,01 substitution par position de nucléotide.

**Tableau 34.** Signatures des séquences nucléotidiques présentes dans le gène codant pour l'ARNr 16S des souches H195, H150, H151 et H199 (*Mzabimycetaceae*) et des représentants des familles les plus proches (*Pseudonocardiaceae* et *Actinopolysporaceae*).

Position	H195, H150, H151 et H199 <i>Mzabimycetaceae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i> *	<i>Actinopolysporaceae</i> **
127 : 234	G-A	G-C	A-U
242 : 284	G-G	G-A	C-G
480	G	U	U
564	C	U	C
657 : 749	G-C	U-A	G-C
672 : 734	C-G	U-G	C-G
828	A	A	A
829 : 857	G-C	G-C	G-C
831 : 855	U-G	U-G	U-G
832 : 854	G-U	G-U	G-U
833 : 853	U-G	U-G	U-G
840 : 846	C-G	C-A	C-G
952 : 1229	U-A	U-A	U-A
986 : 1219	U-G	U-A	U-A
1100	A	A	U
1117 : 1183	C-G	U-U	G-C
1309 : 1328	G-G	G-C	G-U

**Note:** Les nucleotides qui différencient clairement la famille des *Mzabimycetaceae* et les familles les plus proches, *Pseudonocardiaceae* et *Actinopolysporaceae*, sont indiqués en gras.

\* Données de Zhi *et al.* (2009), Mao *et al.* (2011) et Labeda et Goodfellow (2012).

\*\* Données de Zhi *et al.* (2009) et Goodfellow et Trujillo (2012).

## 2. Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN a été effectuée uniquement pour les souches appartenant éventuellement à de nouveaux taxons, à savoir:

- trois souches du nouveau genre *Mzabimyces*: H195, H150, H151.

- deux souches de *Prauserella*, H225 et H137, dont la similarité du gène codant pour l'ARN 16S est respectivement de 98,9 et 99,4% vis-à-vis de *P. flava*, l'espèce la plus proche.

- une souche d'*Actinopolyspora*, H254 (similarité avec *A. saharensis* = 99,0%).

- une autre souche d'*Actinopolyspora*, H255 ((similarité avec *A. erythrea* = 99,2%).

Deux répétitions ont été faites pour chaque test.

## 2.1. Souches H195, H150 et H151 de *Mzabimyces*

L'hybridation ADN-ADN a tout d'abord été réalisée entre les souches H150, H151 et H195, pour savoir si elles appartiennent à une même espèce ou à des espèces différentes de *Mzabimyces*. Les résultats ont montré que H195 possède 73,9% de parenté avec H150 et 97,3% de parenté avec H151. La souche H150 possède 70,5% de similarité avec H151. Ces valeurs sont supérieures à la limite de 70% proposée par Wayne *et al.* (1987) pour différencier deux espèces distinctes. Ces données permettent de conclure que les souches H195, H150 et H151 représente une seule nouvelle espèce du genre *Mzabimyces*, pour laquelle le nom *Mzabimyces algeriensis* a été proposé.

Les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches H195, H150 et H151 ont été déposées dans la GenBank sous les numéros d'accessions KJ574202, KJ574200, et KJ574201, respectivement. La souche H195<sup>T</sup> a été choisie comme souche-type et a été déposée dans la collection DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Allemagne) sous le numéro DSM 46680<sup>T</sup> et la collection MTCC (Microbial Type Culture Collection, India) sous le numéro MTCC 12101<sup>T</sup>.

## 2.2. Souches H225 et H137 de *Prauserella*

L'ADN des souches H225 et H137 a été hybridé d'abord entre elles, puis avec ceux des espèces les plus proches phylogénétiquement.

Le pourcentage de similarité entre H225 et H137 est de 94,0% (moyenne de deux essais: 90,0 et 98,1%). Ce pourcentage est nettement supérieur à 70%, qui est la limite proposée par Wayne *et al.* (1987) pour différencier les espèces entre elles. De ce fait, les souches H225 et H137 appartiennent à une même espèce.

La souche H225 a été choisie pour être hybridée avec les espèces les plus proches phylogénétiquement. Cette souche possède les similarités suivantes:

- 40,6% (moyenne de deux essais: 37,6 et 43,6%) avec *Prauserella aidingensis*.
- 27,9% (32,8 et 23,0%) avec *P. salsuginis*.

- 45,0% (49,0 et 41,0%) avec *P. sediminis*.
- 43,6% (40,7 et 46,5%) avec *P. flava*.
- 65,5% (68,4 et 62,6%) avec *P. alba*.

Ces résultats nous permettent de conclure que les souches H225 et H137 représentent une nouvelle espèce de *Prauserella* et le nom de *Prauserella isguenensis* (de Beni isguen, M'zab) leur a ainsi été attribué. La souche H225<sup>T</sup> a été choisie comme souche-type.

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche H225<sup>T</sup> a été déposée dans la GenBank sous le numéro d'accèsion KJ504173. La souche, quant à elle, a été déposée dans deux collections, la DSMZ, sous le numéro DSM 46664<sup>T</sup>, et la CECT (Spanish Type Culture Collection) sous le numéro CECT 8577<sup>T</sup>.

### 2.3. Souche H254 d'*Actinopolyspora*

L'ADN de la souche H254 a été hybridé avec ceux d'*Actinopolyspora saharensis*, *A. halophila* et *A. algeriensis*, qui sont les espèces les plus proches phylogénétiquement. Les pourcentages de similarité (moyenne de deux essais) avec les espèces citées sont respectivement de 60,7% (57,2 et 64,2%), 69,3% (68,4 et 70,3%) et 43,1% (45,6 et 40,7%). Ces taux sont inférieurs à 70%, limite proposée par Wayne *et al.* (1987) pour différencier les espèces entre elles.

Ces données permettent de conclure que la souche H254 représente une nouvelle espèce du genre *Actinopolyspora* et le nom d'*Actinopolyspora biskrensis* (isolée de la région de Biskra) lui a ainsi été attribué.

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche H254 a été déposée dans la GenBank sous le numéro d'accèsion KJ504178. La souche H254 a été déposée dans la collection DSMZ sous le numéro DSM 46684<sup>T</sup>, et la collection CECT sous le numéro 8576<sup>T</sup>. Elle constitue la souche-type de l'espèce *A. biskrensis*.

### 2.4. Souche H255 d'*Actinopolyspora*

L'ADN de la souche H255 a été hybridé avec celui de l'espèce la plus proche phylogénétiquement, à savoir *Actinopolyspora erythraea*. Le pourcentage de similarité obtenu est de 88,3% (90,9 et 85,8%), ce qui est très supérieur à 70%, limite proposée par Wayne *et al.* (1987) pour différencier les espèces entre elles. Ce résultat nous conduit à conclure que la souche H255 appartient bien à l'espèce *Actinopolyspora erythraea*.

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche H255 a été déposée dans la GenBank sous le numéro d'accèsion KJ574190.

### 3. Description de nouveaux taxons

La description des nouveaux taxons concernent uniquement les souches-types. Ces taxons sont *Mzabimyces algeriensis* (souche H195<sup>T</sup>), *Prauserella isguenensis* (souche H225<sup>T</sup>) et *Actinopolyspora biskrensis* (souche H254<sup>T</sup>).

#### 3.1. Description de *Mzabimyces algeriensis* sp. nov. appartenant à un nouveau genre et une nouvelle famille

##### 3.1.1. Description de la famille des *Mzabimycetaceae* fam. nov.

*Mzabimycetaceae* (M.za.bi.my.ce.tace'ae. N.L. masc. n. *Mzabimyces* le genre type de la famille; -aceae suffixe désignant une famille; N.L. fem. pl. n. *Mzabimycetaceae*, la famille de *Mzabimyces*).

Les caractéristiques morphologiques et chimiotaxonomiques sont données dans la description du genre. Le genre-type de cette famille est *Mzabimyces*. Dans le cas de la nouvelle famille des *Mzabimycetaceae*, les séquences des nucléotides ou «signatures» du gène codant pour l'ARNr 16S, qui sont des bases conservées dans des sites fixes pour chaque famille, sont au niveau des positions suivantes: **127:234**, **282:284**, **480**, **564**, **657:749**, **672:734**, 828, 829:857, 831:855, 832:854, 833:853, 840:**846**, 952:1229, 986:**1219**, 1100, **1117:1183** et 1309:**1328**. Les positions en gras permettent de différencier la famille des *Mzabimycetaceae* des deux familles les plus proches, *Actinopolysporaceae* et *Pseudonocardiaceae*.

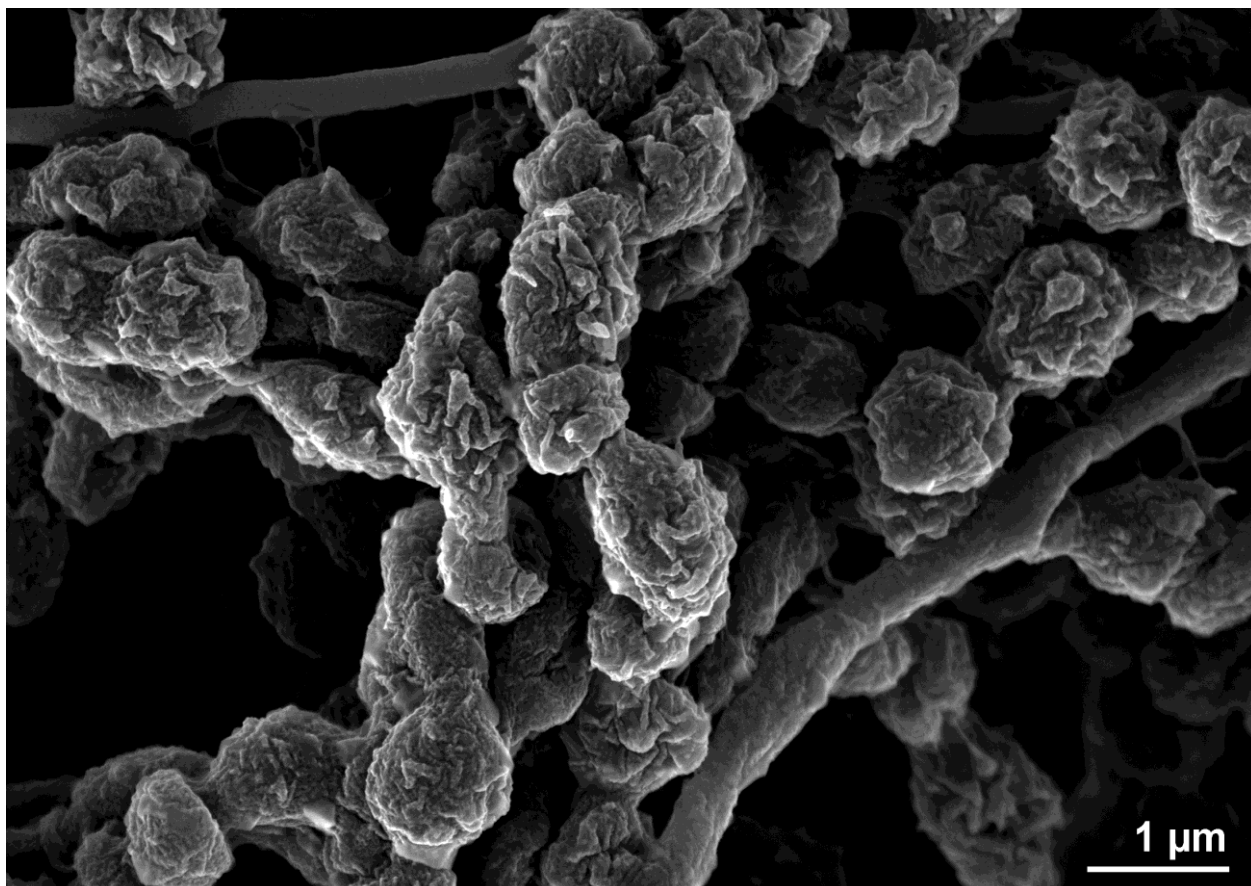
##### 3.1.2. Description du genre *Mzabimyces* gen. nov.

Le nouveau genre est nommé *Mzabimyces* (M.za.bi.my'ces. N.L. masc. n. M'zab, une région aride nommée M'zab dans le sud de l'Algérie, d'où le microorganisme a été isolé)

La souche H195<sup>T</sup> est à Gram positif et strictement halophile. Le mycélium du substrat se fragmente. Le mycélium aérien est moyennement à abondamment produit. Il est blanc à blanc-grisâtre et se différencie en de longues chaînes de spores arrondies à surface rugueuse (Figure 24).

La paroi est de type IVA (acide *meso*-diaminopimélique, arabinose et galactose présents respectivement dans les parois et dans les cellules entières). Les phospholipides sont de type PII

(phosphatidylcholine comme phospholipide membranaire caractéristique), les ménaquinones et les acides gras prédominants sont respectivement MK-9(H<sub>4</sub>) et iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub> et antéiso-C<sub>17:0</sub>. Le pourcentage de G+C de la souche-type H195<sup>T</sup> du nouveau genre *Mzabimyces* est de 68,2 mol%. L'espèce-type est nommée *Mzabimyces algeriensis*.



**Figure 24.** Micromorphologie du mycélium aérien en microscopie électronique à balayage de la souche H195 de *Mzabimyces algeriensis* cultivée pendant deux semaines à 30°C sur le milieu ISP2 additionné de 15% de NaCl. La micrographie montre des chaînes de spores à surface très rugueuse. La barre indique 1 μm.

### 3.1.3. Description de *Mzabimyces algeriensis* sp. nov.

La souche type H195<sup>T</sup> est nommée *Mzabimyces algeriensis* (al.ger.i.en'sis. N.L. fem. adj. *algeriensis* par rapport à l'Algérie, la source du sol à partir duquel cette souche a été isolée).

Les caractéristiques morphologiques et chimiotaxonomiques ont été données dans la description du genre.

Le mycélium aérien est blanc à blanc-grisâtre sur les milieux ISP2, ISP4, gélose nutritive et CMA et est irrégulièrement ramifié en formant des chaînes droites à flexueuses de 3 à 15 spores (0,9-1,2 × 1,0-1,2 µm) par chaîne. Le mycélium du substrat (MS) est jaune clair sur tout les milieux testés mis à part sur ISP4 où il n'est pas coloré. Le MS est bien développé et se fragmente en éléments arrondis non mobiles. Les pigments diffusibles et les pigments mélanoides ne sont pas produits.

La croissance optimale a lieu à 30°C et à pH 7, avec des gammes allant de 20 à 45°C, et des pH de 5 à 9.

La souche dégrade l'adénine, la xanthine, l'hypoxanthine, la L-tyrosine et le Tween 80 mais ne dégrade pas la caséine, l'amidon, la guanine, l'esculine, la gélatine, l'arbutine et la testostérone. Elle utilise l'acétate, le pyruvate, l'adonitol, le butyrate, le maltose, le mannitol, le saccharose, le D-cellobiose, le D-fructose, le D-glucose, le glycérol, le D-lactose, le D-raffinose et le D-sorbitol comme sources de carbone, mais pas le citrate, le *meso*-inositol, la salicine, l'érythritol, le D-mélibiose, le D-tréhalose, le D-ribose, le D-xylose, le D-galactose, le D-mannose, le D-mélézitose, le L-arabinose, le L-rhamnose, le benzoate, le propionate, le succinate et le L-tartrate de sodium. La L-proline est utilisée comme source d'azote, mais pas la L-alanine et la L-sérine. La nitrate réductase n'est pas produite. La croissance a lieu en présence de NaCl à des concentrations de 7, 10, 15, 20, 25 et 30% (optimum 10 à 20%). La souche est résistante à l'érythromycine (15 mg/ml) et à l'acide nalidixique (30 mg/ml) mais elle est sensible à la tétracycline (30 mg/ml) et au lysozyme (0,005%).

La souche-type H195<sup>T</sup> (=DSM 46680<sup>T</sup>=MTCC12101<sup>T</sup>) a été isolée à partir d'un sol provenant de la région du M'zab, au sud de l'Algérie (Sahara algérien).

### 3.2. Description de *Prauserella isguenensis* sp. nov.

La souche H225<sup>T</sup> est nommée *Prauserella isguenensis* (is.guen.en'sis. N.L. fem. adj. *isguenensis*, relative à Béni isguen (région du M'zab), le lieu où cette souche a été isolée).

Le mycélium aérien est blanc sur les milieux ISP2, ISP4, CMA et gélose nutritive et forme à maturité de courtes chaînes de spores droites à flexueuses. Le mycélium du substrat est jaune brunâtre clair sur ISP2, jaune très pâle sur gélose nutritive, beige sur milieu CMA et blanc sur ISP4. Il se fragmente abondamment en éléments en forme de bâtonnets de manière irrégulière. Les pigments diffusibles et les pigments mélanoides ne sont pas produits.



La croissance optimale a lieu à 30°C et à pH 7 avec des gammes allant de 20 à 45°C, et à des pH de 5 à 9. La croissance a lieu en présence de NaCl à concentrations 7, 10, 15, 20, 25 et 30% (optimum 7 à 15%). La souche ne pousse pas à 0% et au delà de 30% de NaCl.

La souche H225<sup>T</sup> dégrade l'amidon, la tyrosine, le Tween 80 et la xanthine mais ne dégrade pas l'adénine, l'esculine, l'arbutine, la caséine, la gélatine, la guanine, l'hypoxanthine et la testostérone. Elle utilise l'adonitol, le L-arabinose, le D-fructose, le D-galactose, le D-glucose, le glycérol, le lactose, le maltose, le mannitol, le raffinose, le L-rhamnose, le D-ribose, le saccharose, le D-xylose, l'acétate, le butyrate, le citrate, le pyruvate et le succinate comme sources de carbone, mais pas le cellobiose, l'érythritol, le *meso*-inositol, le D-mannose, le mélézitose, le mélibiose, la salicine, le D-sorbitol, le tréhalose, le benzoate, l'oxalate, le propionate et le tartrate. La L-proline et la L-alanine sont utilisées comme source d'azote mais pas la L-sérine. La souche est résistante au lysozyme (0,005%) mais reste sensible à l'érythromycine (15 mg/ml), à l'acide nalidixique (30 mg/ml) et à la tétracycline (30 mg/ml).

La souche H225<sup>T</sup> possède une paroi de type IV caractérisé par la présence de l'acide méso-diaminopimélique et l'arabinose et le galactose comme sucres caractéristiques. Le phospholipide détecté taxonomiquement important est la phosphatidylcholine. Les ménaquinones et les acides gras prédominants sont respectivement le MK-9(H<sub>4</sub>) et l'iso-C<sub>16:0</sub>, l'anteiso-C<sub>17:0</sub> et iso C<sub>16:0</sub> 2OH.

La souche-type H225<sup>T</sup> (= *Prauserella isguenensis* DSM 46664<sup>T</sup>) a été isolée à partir d'un sol provenant de la région de Béni isguen (région du M'zab), Sahara algérien.

### 3.3. Description d'*Actinopolyspora biskrensis* sp. nov.

La souche H254<sup>T</sup> est nommée *Actinopolyspora biskrensis* (bis.kren'sis, N.L. fem. adj. *biskrensis* relative à Biskra, la région où cette souche a été isolée).

Le mycélium aérien est blanc à blanc jaunâtre sur les milieux ISP2, ISP4, CMA et gélose nutritive et présente des chaînes droites à flexueuses de 5 à 15 spores (parfois 20 spores) par chaîne. Les spores sont sous forme de bâtonnets non mobiles. La couleur du mycélium du substrat est rose sur gélose nutritive, brun foncé sur ISP4, beige à orange-rougeâtre sur CMA. Le mycélium du substrat est bien développé et se fragmente à maturité en éléments en bâtonnets non mobiles. Les pigments diffusibles sont produits sur gélose nutritive (rose) et sur ISP4 (brun foncé).

La croissance optimale a lieu à 30°C (gamme de croissance: 20 à 37°C) et à pH 7 (gamme de pH: 6 à 8). La croissance a lieu en présence de NaCl aux concentrations 10, 15, 20, 25 et 30% (optimum 15 à 20%), mais pas à 0%, 7% et au delà de 30%.

La souche H254<sup>T</sup> dégrade l'esculine, la gélatine, l'hypoxanthine, l'amidon, le Tween 80 et la xanthine mais ne dégrade pas l'adénine, l'arbutine, la caséine, la guanine, la testostérone et la tyrosine. Elle utilise l'adonitol, le L-arabinose, le D-cellobiose, le citrate, l'érythritol, le D-fructose, le D-galactose, le D-glucose, le glycérol, le D-lactose, le maltose, le D-mannose, le D-raffinose, le L-rhamnose, le D-ribose, le D-sorbitol, le saccharose, le D-tréhalose et le D-xylose comme sources de carbone, mais pas le *meso*-inositol, le D-mannitol, le D-mélézitose, le D-mélibiose, l'acétate, le benzoate, le butyrate, l'oxalate, le propionate, le pyruvate, le succinate et le tartrate. La L-sérine est utilisée comme source d'azote mais pas la L-alanine et la L-proline. La souche est résistante à l'érythromycine (15 mg/ml) et au lysozyme (0,005%) mais reste sensible à l'acide nalidixique (30 mg/ml) et à la tétracycline (30 mg/ml).

La souche H254<sup>T</sup> possède une paroi de type IVA (acide méso-diaminopimélique, arabinose et galactose). Le phospholipide diagnostic détecté est la phosphatidylcholine. Les ménaquinones prédominants sont MK-9(H<sub>4</sub>), MK-10(H<sub>4</sub>) et les acides gras principaux sont anteiso-C<sub>17:0</sub>, iso-C<sub>15:0</sub> et iso-C<sub>17:0</sub>.

La souche-type H254<sup>T</sup> (= *Actinopolyspora biskrensis* DSM 46684<sup>T</sup>) a été isolée à partir d'un sol provenant de la région de Biskra, au Nord-Est du Sahara algérien.

#### 4. Discussion

Les études phylogénétiques entreprises sur 60 souches représentatives des 91 souches des clusters physiologiques ont permis de confirmer leur appartenance aux genres *Actinopolyspora* (cluster I), *Prauserella* (Cluster II), *Streptomonospora* (cluster III), *Nocardiopsis* (cluster IV), *Saccharopolyspora* (cluster V), *Saccharomonospora* (cluster VI) et enfin *Mzabimyces* (cluster VII) qui s'est révélé être un nouveau genre appartenant à une nouvelle famille (Saker *et al.*, 2014).

##### 4.1. Souches du genre *Actinopolyspora* (cluster I)

Le cluster physiologique I comprend 28 souches parmi lesquelles 15 ont été séquencées et appartiennent au genre *Actinopolyspora*. Ce genre, découvert par Gochnauer *et al.*, (1975), avec l'espèce *A. halophila*, s'est révélé être la première actinobactérie halophile stricte à être mise en

évidence. Le genre *Actinopolyspora* comprend actuellement 12 espèces (Guan *et al.*, 2013a,b; Meklat *et al.*, 2013a,b,c) dont 4 ont été isolées des sols sahariens: *Actinopolyspora algeriensis* (Meklat *et al.*, 2012a), *A. saharensis* (Meklat *et al.*, 2013a), *A. righensis* (Meklat *et al.*, 2013b) et *A. mzabensis* (Meklat *et al.*, 2013c).

Nos résultats ont montré que les souches d'*Actinopolyspora* proviennent des sols salés des régions de Biskra, du M'zab et de Médéa (Boughezoul) (Saker *et al.*, 2015a). La souche H254 est une nouvelle espèce de ce genre et a ainsi été nommée *Actinopolyspora biskrensis* (Saker *et al.*, 2015b). C'est la treizième espèce de ce genre à être décrite et la cinquième à être mise en évidence dans les sols sahariens qui se sont révélés donc très intéressants pour la découverte de nouvelles espèces appartenant à ce genre.

En revanche, la souche H255 (qui est en fait identique du point de vue phylogénétique aux souches H258, H260 et H261) a été rattachée, après hybridation ADN-ADN à l'espèce *Actinopolyspora erythrea*, découverte par Tang *et al.* (2011b). Dans un sol salé de la région de Ouargla, Meklat *et al.* (2011) ont également mis en évidence une souche productrice d'antibiotiques à spectre d'action intéressant, qui, après hybridation ADN-ADN, s'est révélée appartenir à l'espèce *Actinopolyspora mortivallis* (Yoshida *et al.*, 1991), non connue pourtant comme productrice d'antibiotique.

Les autres souches que nous avons isolées se sont révélées être phylogénétiquement proches des espèces existantes. En effet, la souche H202 présente 99,4% de similarité (gène codant pour l'ARNr 16S) avec l'espèce *A. mzabensis* (Meklat *et al.*, 2013c). Les souches H100 et H106 ont de 99,3 à 99,5% avec *A. xinjiangensis* (Guan *et al.*, 2010). Les souches H137, H147, H148, H181, H197, H243 et H244 présentent quant à elles 99,4 à 99,8% de similarité avec *A. saharensis* (Meklat *et al.*, 2013a). Cependant, Meier-Kolthoff *et al.* (2013), puis, par la suite, Kim *et al.* (2014) ont montré, en faisant la corrélation « gène codant pour l'ARNr 16S » et « hybridation ADN-ADN », qu'il existe une probabilité de 50% ou plus d'avoir une nouvelle espèce quand le pourcentage de similarité (ARNr 16S) est voisin de 99,5%. Aussi, pour statuer définitivement sur la position taxonomique de nos 10 souches citées auparavant, il est impératif de faire par la suite l'hybridation ADN-ADN avec les espèces les plus proches.

#### **4.2. Souches du genre *Prauserella* (cluster II)**

Le cluster physiologique II comprend 4 souches, H137, H149, H225 et H206, qui ont été séquencées et rattachées au genre *Prauserella*. Ce dernier a été proposé pour la première fois par Kim

et Goodfellow (1999) après un reclassement d'une souche ayant appartenu auparavant à l'espèce *Amycolatopsis rugosa* (Lechevalier *et al.*, 1986). Le genre *Prauserella* comprend actuellement 11 espèces dont la majorité sont halophiles (Liu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

C'est la première fois que le genre *Prauserella* a été mis en évidence dans les sols algériens. En effet, aucune souche appartenant à ce genre n'a été retrouvé par Boudjelal (2012) et Meklat (2012) qui ont étudié les actinobactéries halophiles. Nos quatre souches proviennent toutes des sols modérément salés de la région du M'zab (Saker *et al.*, 2015a).

Les souches H225<sup>T</sup> et H137 se sont révélées appartenir à une nouvelle espèce qui a été nommée *Prauserella isguenensis* (Saker *et al.*, 2015c). Les souches H149 et H206 sont très proches respectivement de *P. alba* (99,8% de similarité pour le gène codant pour l'ARNr 16S) et *P. aidingensis* (99,9% de similarité). Ceci peut laisser penser à priori que les deux souches appartiennent à ces espèces. Cependant, si l'on tient compte du fait que certaines espèces valides de *Prauserella*, telles que *P. salsuginis*, *P. flava* et *P. sediminis*, possèdent entre elles des pourcentages de similarité très élevés (99,7 à 99,9%) (Li *et al.*, 2009), la possibilité de nouvelles espèces pour nos deux souches n'est donc pas à exclure. Cette hypothèse est appuyée par l'existence de plusieurs différences physiologiques entre les souches H149 et *P. alba* d'une part, et entre H206 et *P. aidingensis* d'autre part.

#### 4.3. Souches du genre *Streptomonospora* (cluster III)

Le cluster physiologique III comprend 7 souches dont trois ont été séquencées: H231, H232 et H238. Elles proviennent toutes des sols très salés de Zelfana (région du M'zab) (Saker *et al.*, 2015a). Ces souches présentent entre elles 99,8 à 99,9% de similarité et appartiennent au genre *Streptomonospora* (Cui *et al.*, 2001). Ce genre comprend actuellement neuf espèces dont une, *Streptomonospora algeriensis*, a été isolée par Meklat *et al.* (2014a) à partir d'un sol salé de la région de Djelfa.

Les souches H231 et H238 présentent 99,4% de similarité (gène codant pour l'ARNr 16S) avec *St. amylolytica* (Cai *et al.*, 2009), tandis que la souche H231 a 99,5% de similarité avec *St. alba* (Li *et al.*, 2003). Plusieurs espèces de *Streptomonospora* possèdent entre elles un pourcentage élevé de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S: 99,9% entre *St. halophila* et *S. arabica*, 99,7% entre *S. flavalba* et *S. alba*, 99,4% entre *St. flavalba* et *S. amylolytica*, etc. (Cai *et al.* (2009). Ces données laissent penser que nos souches de *Streptomonospora* pourraient éventuellement appartenir à une ou deux nouvelles espèces, d'autant plus qu'on a noté des différences physiologiques entre elles et les

espèces les plus proches. Une hybridation ADN-ADN est nécessaire pour statuer sur leur position taxonomique.

#### 4.4. Souches du genre *Nocardiopsis* (cluster IV)

Le cluster physiologique IV comprend 16 souches dont 12 ont été séquencées et rattachées au genre *Nocardiopsis*. Ce genre comprend actuellement 46 espèces dont une, *Nocardiopsis algeriensis* qui est basotolérante, a été isolée à partir d'un sol d'Adrar (Bouras *et al.*, 2015). Plusieurs espèces sont halophiles ou halototérantes (Hozzein et Trujillo, 2012).

Nos souches ont été majoritairement isolées à partir des sols modérément salés de la région du M'zab, à l'exception de deux (H249 et H250) qui proviennent des sols salés de la région de Biskra (Saker *et al.*, 2015a).

Au total, 7 souches (H141, H156, H160, H178, H240, H248 et H250) présentent un pourcentage de similarité (gène codant pour l'ARNr 16S) de 100% avec *N. kunsanensis* (Chun *et al.*, 2000) et 99,9% avec *N. litoralis* (Chen *et al.*, 2009). Ces deux espèces, qui sont phylogénétiquement très proches, sont celles qui sont parmi les plus fréquemment isolées dans les sols salés du Sahara algérien, avec *N. xinjiangensis* (Boudjelal, 2012; Meklat, 2012). La souche H224 présente également 100% de similarité avec *N. arvandica* (Hamedi *et al.*, 2011) et 99,9% avec *N. sinuspersici* (Hamedi *et al.*, 2010), tandis que la souche H159 est très proche (99,9%) de *N. halotolerans* (Al Zarban *et al.*, 2002b). Des pourcentages plus bas sont obtenus avec les souches H139 et H239 (respectivement 99,4 et 99,6% de similarité avec *N. xinjiangensis*) et la souche H249 (99,5% de similarité avec *N. halotolerans*).

Plusieurs espèces de *Nocardiopsis*, pourtant validées par l'hybridation ADN-ADN, sont connues dans la littérature pour avoir entre elles des pourcentages de similarité très élevés (99,4, 99,6 ou souvent même 99,9%). C'est le cas de *Nocardiopsis valliformis* et *Nocardiopsis exhalans* (99,9%) (Solanki *et al.* 2008), *Nocardiopsis sinuspersici* et *Nocardiopsis arvandica* (99,9%) (Hamedi *et al.* 2011), *Nocardiopsis halophila* et *Nocardiopsis baichengensis* (99,9%) (Li *et al.* 2006), *Nocardiopsis litoralis* et *Nocardiopsis kunsanensis* (99,6%) (Chun *et al.* 2000) et *Nocardiopsis metallicus* et *Nocardiopsis exhalans* (99,4%) (Schippers *et al.* 2002).

Ces données montrent donc que nos souches H139, H239 et H249 (qui présentent des pourcentages de similarité de 99,4, 99,5 et 99,6 avec les espèces proches, et également des différences physiologiques) pourraient appartenir à deux, voire même trois nouvelles espèces. Les résultats doivent être confirmés par l'hybridation ADN-ADN.

#### 4.5. Souches du genre *Saccharopolyspora* (cluster V)

Le cluster physiologique V comprend 13 souches dont 6 ont été séquencées et rattachées au genre *Saccharopolyspora*. Ce genre comprend actuellement 24 espèces dont une, *Saccharopolyspora ghardaiensis* a été isolée à partir d'un sol de Ghardaïa (Meklat *et al.*, 2014b). Quelques espèces sont halophiles ou halototérantes (Kim et Goodfellow, 2012b).

Nos souches ont été majoritairement isolées à partir des sols modérément salés de la région du M'zab (Saker *et al.*, 2015a).

La souche H145 présente 99,6% de similarité (gène codant pour l'ARNr 16S) avec *Saccharopolyspora lacisalci* (Guan *et al.*, 2011). Les souches H154, H157 et H208 ont 99,4, 99,6 et 99,4% respectivement avec *S. halophila* (Tang *et al.*, 2009a). Les souches H212 et H213 sont très proches de *S. halophila* (99,8 à 99,9% de similarité).

Des pourcentages de similarité (gène codant pour l'ARNr 16S) relativement élevés sont observés entre certaines espèces de *Saccharopolyspora*, comme *S. erythrea* et *S. spinosporotrichia* (99,7%) et *S. pathumthaniensis* et *S. dendranthema*. Comme des différences physiologiques, parfois importantes sont en plus notées entre nos souches et les espèces les plus proches, il se pourrait que l'on soit en présence d'une ou de deux espèces (sous réserve d'une hybridation ADN-ADN).

#### 4.6. Souches du genre *Saccharomonospora* (cluster VI)

Le cluster physiologique VI comprend 19 souches dont 16 ont été séquencées et rattachées au genre *Saccharomonospora*. Ce genre comprend actuellement quelques espèces qui sont halophiles ou halotolérantes et certaines autres sont thermophiles (Kim, 2012).

Nos souches ont toutes été isolées de la région du M'zab, soit à partir des sols très salés de Zelfana (4 souches), soit à partir des sols modérément salés des autres communes de la région (Saker *et al.*, 2015a). A l'exception de la souche H220 qui présente 100% de similarité (gène codant pour l'ARNr 16S) avec *Sm. saliphila* (Syed *et al.*, 2008), les autres souches se rapprochent de *Sm. paurometabolica* (Li *et al.*, 2003a), mais à des degrés divers: 99,4% (H216 et H234), 99,5% (H218 et H229), 99,6% (H126, H155, H196, H198, H203, H215, H227, H233 et H247) et 99,7% (H217 et H223). Boudjelal (2012) et Meklat (2012) ont également constaté que les souches qui sont proches de *Sm. paurometabolica* sont les plus fréquentes parmi les *Saccharomonospora* dans les sols sahariens.

Quelques espèces de *Saccharomonospora* possèdent entre elles un pourcentage relativement élevé de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S: 99,6% entre *Sm. amisosensis* et *Sm. marina* (Veyisoglu *et al.*, 2013), et 99,6% également entre *Sm. paurometabolica* et *Sm. halophila* (Li *et*

al.,2003). Ces données laissent entrevoir la possibilité de nouvelles espèces de *Saccharomonospora*, d'autant plus que nos souches diffèrent physiologiquement de l'espèce *Sm. paurometabolica*. Une hybridation ADN-ADN est nécessaire pour statuer sur la position taxonomique de nos souches.

#### 4.7. Souches du genre *Mzabimyces* (cluster VII)

Le cluster physiologique VII comprend 4 souches qui ont été séquencées et rattachées au genre nouvellement décrit, *Mzabimyces*, avec comme unique espèce *Mzabimyces algeriensis* (Saker *et al.*, 2014). Les 4 souches proviennent d'un sol modérément salé de la région du M'zab.

Les souches appartiennent non seulement à un genre qui s'est révélé être différents des genres connus d'actinobactéries, mais aussi, à une nouvelle famille appelée *Mzabimycetaceae*, différente des familles existantes et ce, sur la base des signatures des nucléotides du gène codant pour l'ARNr 16S. En effet, c'est sur cette base que les familles sont définies (Stackebrandt *et al.*, 1997; Zhi *et al.*, 2009).

Ces dernières années, plusieurs genres halophiles nouveaux ont été décrits, dont l'un, très récemment, provenant d'un sol de la région d'El Goléa, et qui a été appelé *Bounagaea algeriensis* (Meklat *et al.*, 2015).

### 5. Conclusion

Les investigations de recherches sur les actinobactéries halophiles des sols salés sahariens des régions du M'zab, de Biskra, de Médéa et de M'sila ont donné des résultats intéressants dont certains ont été valorisés.

Trois nouveaux taxons ont ainsi été décrits: *Mzabimyces algeriensis* (nouvelle espèce appartenant à un nouveau genre et une nouvelle famille), *Prauserella isguenensis* et *Actinopolyspora biskrensis*.

Cependant, plusieurs autres souches sont aussi candidates pour être de nouvelles espèces, sous réserves des hybridations ADN-ADN qui doivent être entreprises dans le futur. Ces souches appartiennent aux genres *Actinopolyspora*, *Prauserella*, *Streptomonospora*, *Nocardiopsis* et *Saccharomonospora*.

Ces résultats montrent donc le riche potentiel en actinobactéries des sols sahariens, qu'il s'agira d'exploiter encore plus à l'avenir, aussi bien du point de vue taxonomique en recherchant de nouveaux taxons, mais aussi du point de vue des potentialités de production des substances bioactives

(antibiotiques, enzymes et autres composés) dont les activités pourraient persister même dans les milieux à hautes teneurs en NaCl.

## V. PROPRIETES ANTAGONISTES DES ACTINOBACTERIES HALOPHILES

### 1. Mise en évidence sur milieu gélosé

Les 91 souches d'actinobactéries halophiles ont été testées contre des bactéries, des champignons filamenteux et des levures par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu ISP2 contenant 15% de NaCl, et ce, pour évaluer leurs potentialités de production d'antibiotiques. Les résultats de ces tests sont consignés dans le Tableau 35.

Sur les 91 souches, 69 (75,8%) se sont montrées actives contre au moins un germe-cible. En revanche, 22 autres (24,2%) n'ont présenté aucune activité. Les 69 souches actives ont toutes une action antifongique (dont 47 essentiellement antifongique et 22 à la fois antifongique et antibactérienne). Aucune souche n'a une activité dirigée uniquement contre les bactéries.

Les microorganismes-cibles les plus sensibles sont *Aspergillus carbonarius* M333 (sensible à 68 souches) et *Umbelopsis ramanniana* (sensible à 58 souches). Pour les autres germes-cibles, le nombre de souches d'actinobactéries halophiles actives est de 45 contre *Candida albicans* M3, 35 contre *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226, 20 contre *Penicillium expansum* PE1, 19 contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633, 16 contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c, 5 contre *Klebsiella pneumoniae* E40 et 1 contre *Fusarium culmorum* FC1 qui s'est avéré être le plus résistant.

Il est intéressant de noter que le pourcentage le plus élevé de souches actives (100%) est obtenu chez les genres *Nocardiopsis* et *Prauserella*. Ces deux genres, ainsi que, à un degré moindre, *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora*, présentent aussi une activité contre un plus grand nombre de germes-cibles par rapport aux autres genres. Le nombre de souches actives par genre s'établit comme suit: 16 (sur 16) pour les *Nocardiopsis*, 4 (sur 4) pour les *Prauserella*, 4 (sur 7) pour les *Streptomonospora*, 8 (sur 19) pour les *Saccharomonospora*, 25 (sur 28) pour les *Actinopolyspora*, 11 (sur 13) pour les *Saccharopolyspora* et 1 (sur 4) pour le genre *Mzabimyces*.

Parmi les 91 souches, certaines ont montré des activités assez fortes à très fortes. Nous pouvons ainsi citer:

- Les souches H255, H256, H258, H260, H261 et H262, rattachées à l'espèce *Actinopolyspora erythraea*, qui possède une très forte activité contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c résistant à la méthicilline (diamètre d'inhibition: 34 à 46 mm). Ces souches ont également une activité, parfois appréciable, contre certains champignons.



- Les 16 souches de *Nocardiosis* (proches de *N. kunsanensis*, *N. litoralis*, *N. xinjiangensis*, *N. halotolerans* et *N. arvandica*) et les quatre souches de *Prauserella* (appartenant à la nouvelle espèce, *P. isguenensis* ou proches d'elle) qui ont une bonne activité dirigée surtout contre les champignons filamenteux et les levures dont *Candida albicans*.
- Les souches H220 (identique à *Saccharomonospora saliphila*), H148, H181, H182 et H243 (proche d'*Actinopolyspora saharensis*), H254 (*Actinopolyspora biskrensis*, nouvelle espèce) et H152, H154, H167, H168, H169, H193 et H194 (proches de *Saccharopolyspora halophila*) qui ont toutes une activité antifongique appréciable à forte.

## 2. Recherche de potentialités antagonistes des actinobactéries non actives par le screening moléculaire

Le milieu de culture utilisé dans cette étude n'a peut être pas fourni toutes les conditions physiques (comme la température, le pH, agitation, etc.) et chimiques (nutriments organiques, minéraux, etc.) nécessaires pour stimuler la production des métabolites secondaires bioactifs par nos souches. Par conséquent, les 22 souches inactives ont été évaluées pour le potentiel à produire des composés bioactifs en détectant par PCR les gènes codant pour les "polyketides synthases" (PKS-I, PKS-II et PKSE) et les "non-ribosomal peptide synthetases" (NRPS) en utilisant des amorces qui ont été cités précédemment (voir la partie « matériel et méthodes »). Nous avons constaté que:

- Plus de 87% des souches non actives possèdent le gène codant pour les NRPS.
- 50% des souches non actives ont le gène codant pour les PKS II comme cela est indiqué dans le Tableau 36. En revanche, les séquences PKSE et PKS-I ont été détectées seulement chez 13,6% et 9,1%, respectivement, des 22 souches non actives étudiées.
- La souche H145 (proche de *Saccharopolyspora lacisalci*) est la seule à posséder les 4 gènes codant pour les NRPS, PKS-I, PKS-II et PKSE.
- La souche H150 (*Mzabimyces algeriensis*, nouvelle espèce appartenant à un nouveau genre et une nouvelle famille) possède quant à elle trois gènes codant pour les NRPS, PKS-II et PKSE.
- La souche H147 (proche d'*Actinopolyspora saharensis*) possède également trois gènes (PKS-I, PKS-II et NRPS).
- Les autres souches possèdent 0, 1 ou 2 gènes et appartiennent aux genres *Actinopolyspora*, *Mzabimyces*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* et *Streptomonospora*.

**Tableau 35.** Propriétés antagonistes des souches d'actinobactéries halophiles.

Genre	Souches	Activité <sup>a</sup> (mm) contre:								
		<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> M3	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> E40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	<i>Fusarium culmorum</i> FC1	<i>Penicillium expansum</i> PE1	<i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333
<i>Nocardiopsis</i>	H139	-	14	20	17	30	-	-	24	38
	H141	-	15	21	14	17	-	14	24	30
	H142	14	16	18	14	16	-	-	24	26
	H156	18	18	21	-	26	-	-	28	22
	H159	-	-	18	-	17	-	16	29	20
	H160	18	18	19	-	18	-	-	27	15
	H165	-	-	24	-	21	-	17	26	30
	H176	14	14	18	-	18	-	-	24	30
	H178	-	-	18	-	18	-	15	28	28
	H180	-	-	22	-	24	-	16	25	28
	H224	-	-	20	-	15	-	20	23	29
	H239	-	-	17	16	-	-	15	23	19
	H240	17	17	18	-	24	-	17	23	19
	H248	-	-	17	-	-	-	-	22	19
	H249	-	16	20	-	20	-	19	24	24
H250	21	21	20	-	16	-	20	20	20	
<i>Prauserella</i>	H137	-	-	18	14	20	-	-	20	28
	H149	-	-	17	-	40	-	18	34	22
	H206	-	-	17	-	24	-	22	24	19
	H225	-	-	20	-	28	-	24	28	22

**Note:** a = activité estimée par la mesure, en mm, de la zone claire autour des cylindres d'agar (le diamètre du cylindre d'agar qui est de 12 mm est inclu); – = absence d'activité. Un disque de milieu ISP2 gélosé non ensemencé et contenant 15% de NaCl sert à chaque fois de témoin.

Suite du tableau 35.

Genre	Souches	Activité <sup>a</sup> (mm) contre:								
		<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> M3	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> E40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	<i>Fusarium culmorum</i> FC1	<i>Penicillium expansum</i> PE1	<i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333
<i>Streptomonospora</i>	H122	26	27	-	-	-	-	-	-	16
	H124	-	-	-	-	-	-	-	19	14
	H231	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H232	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H235	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	H236	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	H238	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomonospora</i>	H126	-	-	-	-	-	-	-	16	18
	H155	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H170	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	H196	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H198	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H203	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H215	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H216	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H217	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H218	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H220	-	-	18	-	20	-	16	28	22
	H221	-	-	-	-	-	-	-	19	21
H222	21	-	-	-	-	-	-	28	20	

**Note:** a = activité estimée par la mesure, en mm, de la zone claire autour des cylindres d'agar (le diamètre du cylindre d'agar qui est de 12 mm est inclu); – = absence d'activité. Un disque de milieu ISP2 gélosé non ensemencé et contenant 15% de NaCl sert à chaque fois de témoin.

Suite du tableau 35.

Genre	Souches	Activité <sup>a</sup> (mm) contre:								
		<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> M3	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> E40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	<i>Fusarium culmorum</i> FC1	<i>Penicillium expansum</i> PE1	<i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333
<i>Saccharomonospora</i>	H223	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H227	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	H229	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H233	-	-	-	-	-	-	-	20	18
	H234	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H247	-	-	-	-	18	-	-	-	19
<i>Actinopolyspora</i>	H100	-	-	17	-	-	-	-	15	15
	H101	-	-	14	-	-	-	-	15	19
	H102	-	-	-	-	-	-	-	14	15
	H103	-	-	-	-	-	-	-	14	-
	H104	-	-	14	-	-	-	-	19	16
	H105	-	-	17	-	-	-	-	20	17
	H106	-	-	17	-	-	-	-	14	15
	H133	-	-	16	-	-	-	-	20	20
	H147	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H148	-	-	18	-	30	-	-	21	20
	H181	-	-	19	-	-	-	-	20	26
H182	-	-	18	-	-	-	-	21	26	

**Note:** a = activité estimée par la mesure, en mm, de la zone claire autour des cylindres d'agar (le diamètre du cylindre d'agar qui est de 12 mm est inclu); – = absence d'activité. Un disque de milieu ISP2 gélosé non ensemencé et contenant 15% de NaCl sert à chaque fois de témoin.

Suite du tableau 35.

Genre	Souches	Activité <sup>a</sup> (mm) contre:								
		<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> M3	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> E40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	<i>Fusarium culmorum</i> FC1	<i>Penicillium expansum</i> PE1	<i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333
<i>Actinopolyspora</i>	H197	-	-	17	-	21	-	-	18	19
	H200	-	-	14	-	-	-	-	-	23
	H201	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H202	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H209	-	-	-	-	-	-	-	15	19
	H243	-	-	-	-	28	-	-	28	17
	H244	-	-	16	-	-	-	-	25	18
	H245	-	-	14	-	-	-	-	25	20
	H254	-	-	17	-	17	15	19	20	24
	H255	46	32	-	-	14	-	-	-	18
	H256	44	34	-	-	-	-	-	-	18
	H257	-	-	-	-	-	-	-	17	16
	H258	42	34	-	-	-	-	-	-	18
	H260	36	33	18	-	23	-	22	21	22
	H261	34	31	17	-	22	-	19	18	19
H262	34	31	17	-	22	-	18	18	21	
<i>Saccharopolyspora</i>	H111	-	-	16	-	16	-	-	21	18
	H145	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Note:** a = activité estimée par la mesure, en mm, de la zone claire autour des cylindres d'agar (le diamètre du cylindre d'agar qui est de 12 mm est inclu); – = absence d'activité. Un disque de milieu gélosé non ensemencé et contenant 15% de NaCl sert à chaque fois de témoin.

Suite du tableau 35.

Genre	Souches	Activité <sup>a</sup> (mm) contre:								
		<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> M3	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> E40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	<i>Fusarium culmorum</i> FC1	<i>Penicillium expansum</i> PE1	<i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333
<i>Saccharopolyspora</i>	H152	22	15	24	-	37	-	20	36	25
	H154	-	-	-	-	28	-	15	28	19
	H166	-	-	14	-	-	-	-	16	20
	H167	-	-	18	-	28	-	-	30	23
	H168	-	-	-	-	28	-	-	33	20
	H169	-	-	15	-	19	-	-	36	20
	H193	-	14	15	-	-	-	-	32	30
	H194	17	15	14	-	-	-	-	28	24
	H208	-	-	-	-	24	-	14	19	18
	H212	-	-	-	-	-	-	-	34	19
<i>Mzabimyces</i>	H150	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H151	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H195	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H199	-	-	-	-	-	-	-	-	20

**Note:** a = activité estimée par la mesure, en mm, de la zone claire autour des cylindres d'agar (le diamètre du cylindre d'agar qui est de 12 mm est inclu); - = absence d'activité. Un disque de milieu gélosé non ensemencé et contenant 15% de NaCl sert à chaque fois de témoin.

**Tableau 36.** Fréquences des gènes PKS-I, PKS-II, PKSE et NRPS impliqués dans la synthèse de biomolécules chez les actinobactéries halophiles inactives sur milieu solide ISP2.

Souches	Présence du gène			
	PKS I	PKS II	PKSE	NRPS
H145	+	+	+	+
H147	+	+	-	+
H150	-	+	+	+
H151	-	-	-	+
H155	-	-	-	+
H195	-	-	-	-
H196	-	-	-	-
H198	-	-	-	+
H201	-	+	-	+
H202	-	+	-	+
H203	-	+	-	+
H213	-	-	-	+
H215	-	-	+	+
H216	-	-	-	+
H217	-	-	-	+
H218	-	-	-	-
H223	-	-	-	+
H229	-	+	-	+
H231	-	+	-	+
H232	-	+	-	+
H234	-	+	-	+
H238	-	+	-	+

**Note:** -: Absent ; + : Présent

### 3. Discussion

Le pouvoir antimicrobien des 91 souches d'actinobactéries halophiles des sols sahariens a été effectué par la méthode des disques d'agar contre 9 microorganismes-cibles: deux bactéries à Gram positif, une bactérie à Gram négatif, deux levures et quatre champignons filamenteux. Sur les 91

souches, 69 (75,8%) se sont montrées actives contre au moins un germe-cible. Les souches actives ont inhibé surtout les champignons filamenteux et les levures. En effet, 69 souches ont montré une activité antifongique, 20 souches sont actives contre les bactéries à Gram positif et 5 contre la bactérie à Gram négatif testée.

Les activités ont été obtenues surtout chez les genres *Nocardiopsis* et *Prauserella*, et à un degré moindre, *Actinopolyspora*.

Des travaux antérieurs effectués au sein de notre laboratoire sur les actinobactéries des sols sahariens ont montré la production d'antibiotiques actifs chez la grande majorité des souches appartenant au genre *Nocardiopsis*, cette activité étant dirigée contre les bactéries à Gram positif et les champignons mais très rarement contre les bactéries à Gram négatif (Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2005). Ces résultats rejoignent ceux qu'on a obtenus dans le présent travail. Les *Nocardiopsis* sont connus pour être des producteurs d'une grande variété de molécules bioactives: antifongiques, antibactériens (phénazine, iodine, 3-tréhalosamine, thiolactomycine, etc.), herbicides, insecticides, et antitumoraux (pendolmycine) (Kroppenstedt et Evtushenko, 2006; Genilloud *et al.*, 2011).

L'activité des autres genres, moins fréquemment isolés, tels que *Saccharomonospora*, *Streptomonospora* et *Actinopolyspora*, est très rarement mentionnée dans la littérature.

Nos souches de *Saccharomonospora* ont montré une activité contre les bactéries à Gram positif et les champignons, ce qui concorde avec les résultats obtenus par Greiner-Mai *et al.* (1988) et Meklat *et al.* (2011). Une activité antibactérienne et surtout antifongique est notée chez quelques souches de *Streptomonospora* et *Saccharomonospora*, cette activité étant dirigée surtout contre *Aspergillus carbonarius* et *Umbelopsis ramanniana*. Des études antérieures ont rapportés une activité antibactérienne et antifongique chez deux souches halophiles de *Saccharomonospora* (Boudjelal *et al.*, 2011), proches de *Sm. paurometabolica*, comme c'est le cas pour nos souches.

Aucune activité antibactérienne n'a été décelée chez les quatre souches de *Prauserella* qui ont montré par contre une activité antifongique intéressante, y compris la nouvelle espèce que nous avons mise en évidence, *P. isguenensis*. Une activité antibactérienne (contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif) a été détectée chez une souche de *Prauserella marina* (halophile) par Prashanthi et Varalakshmi (2015), mais pas d'activité antifongique.

Des activités antibactériennes très intéressantes ont été obtenues chez plusieurs souches appartenant au genre *Actinopolyspora*. Les plus grandes activités antibiotiques ont été obtenues contre les bactéries à Gram positif ce qui concorde avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui



mentionnent la sensibilité aux antibiotiques des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif (Sabaou *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 2007). Certaines espèces de ce genre sont connues pour la production de molécules bioactives, comme c'est le cas d'*A. erythraea* qui sécrète des érythromycines (Chen *et al.*, 2014), d'une nouvelle souche d'*A. mortivallis* à forte activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Meklat *et al.*, 2012b) ou encore une souche d'*A. halophila* qui sécrète des  $\beta$ -Lactamases (Johnson et Lanthier, 1986). En revanche, la nouvelle espèce, *A. biskrensis* (souche H254) que nous avons découverte s'est montrée strictement antifongique.

Les six souches notées H255, H256, H258, H260, H261 et H262 qu'on a rattachées, après hybridation ADN-ADN, à l'espèce *Actinopolyspora erythrea*, se sont révélées très fortement actives contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, mais elles possèdent également des activités antifongiques appréciables. Huang *et al.* (2009) ont constaté que la souche-type de l'espèce *A. erythrea* possède une très forte activité contre les bactéries à Gram positif (comme les nôtres) et qu'elle sécrète l'érythromycine C et deux nouveaux dérivés du groupe des érythromycines. Ce groupe est justement connu pour sa forte activité contre les bactéries à Gram positif. Nos souches pourraient donc sécréter aussi des érythromycines (au vu de leurs activités similaires à la souche-type d'*A. erythrea*). Cependant, elles peuvent sécréter en plus d'autres antibiotiques, puisqu'elles ont montré une activité antifongique qui n'a pas été détectée chez *A. erythrea*. Il serait donc intéressant de caractériser à l'avenir les molécules bioactives de nos six souches.

En ce qui concerne *Mzabimyces algeriensis* (nouvelle espèce, nouveau genre), les souches n'ont montré aucune activité à l'exception de la souche H199, active uniquement contre *Aspergillus carbonarius*.

La capacité des souches halophiles non actives (sur milieu solide) à produire des molécules bioactives a été examinée par la recherche des gènes codant pour les "polyketides synthases" (PKS-I, PKS-II et PKSE) et les "non-ribosomal peptide synthetases" (NRPS). Les résultats ont montré que les gènes codant pour les NRPS sont les plus fréquents (87%) suivi par les gènes codant pour les PKS-II (50%), puis PKSE (13,6%) et enfin PKS-I (9,1%). L'absence d'activité sur le milieu de culture, malgré la présence de ces gènes chez ces souches peut être expliquée par les conditions et les nutriments utilisés pour la mise en évidence de l'activité qui sont inadéquats pour l'expression de ces gènes. La variation des paramètres de culture pourrait ainsi offrir des possibilités pour l'expression de ces gènes (Janso et Carter, 2010).

Des travaux réalisés par Metsä-Ketelä *et al.* (1999) et Ayuso-Sacido et Genilloud (2005) sur de grandes collections de souches d'actinobactéries de référence ont montré la fréquence appréciable des

gènes codant pour les NRPS et la rareté de ceux codant pour les PKS-I, comme dans notre cas. La fréquence élevée des gènes codant pour les NRPS peut être expliquée en partie par l'efficacité des amorces A3F-A8R qui ont été élaborées pour amplifier les domaines d'adénylation du gène NRPS tel que rapporté par Magarvey *et al.* (2006) et Janso et Carter (2010). La faible détection des gènes de PKS I a déjà été rapportée par Qin *et al.* (2009). Le pourcentage des souches halophiles des sols sahariens contenant les gènes codant pour les PKSE concorde avec celui trouvé par Zazopoulos *et al.* (2003) chez des souches isolées également à partir des sols.

Le potentiel génomique et le potentiel effectif des souches d'actinobactéries halophiles à produire des molécules bioactives nous incite à ne pas écarter des souches présumées non actives dans les programmes de recherche des molécules bioactives, mais d'essayer de chercher les conditions favorables pour faire exprimer les gènes codant pour ces molécules qui pourraient être présents dans les génomes de ces bactéries.

**CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le cadre des travaux de recherche de notre laboratoire sur les actinobactéries des sols sahariens et des régions semi-arides, et plus particulièrement ceux concernant les actinobactéries halophiles, nous avons orienté nos recherches sur les sols sahariens des régions du M'zab et de Biskra, mais aussi sur quelques échantillons de sols des régions de M'sila et de Bougezoul (Médéa). Pour cela, nous avons choisi 24 échantillons modérément salés à très salés.

Les analyses ont été effectuées sur deux milieux de culture, l'un riche et complexe (milieu CMA ou « complex medium agar ») et l'autre pauvre (milieu CHV ou chitine-vitamines agar), en utilisant pour chacun deux concentrations de NaCl: 15 et 20%.

Les actinobactéries halophiles ont été retrouvées dans 23 sols sur les 24 analysés. En effet, seul l'échantillon AB1 d'Aberda (région du M'zab) en a été exempt. Elles sont présentes en petites quantités: quelques dizaines à quelques centaines par gramme de sols secs, ce qui rejoint en quelque sorte les résultats trouvés par certains chercheurs de notre laboratoire dans d'autres régions sahariennes, mais aussi d'autres chercheurs de par le monde. Le nombre d'actinobactéries halophiles varie selon les échantillons de sols (sans qu'il soit corrélé vraiment à la conductivité électrique) et selon les milieux de culture (le CMA et le CHV pouvant être meilleurs l'un par rapport à l'autre, selon les échantillons de sols) et aussi selon les concentrations en NaCl (les densités sont plus élevées à 15%). Il faut quand même noter que le milieu CHV est plus adéquat car il est plus sélectif pour les actinobactéries mycéliennes, la croissance des autres bactéries étant très limitée ou même nulle. Ce milieu permet également une bonne sporulation des actinobactéries, de sorte que l'on peut choisir beaucoup plus facilement les colonies à retenir en nous basant sur leur diversité non seulement macromorphologique, mais aussi micromorphologique.

Au total, 91 souches provenant des divers échantillons ont été retenues pour une étude taxonomique polyphasique, basée sur les caractéristiques morphologiques, physiologiques, chimiques et moléculaires, tel que cela se fait habituellement pour les actinobactéries.

En tenant compte de leur morphologie, les 91 souches ont été classées dans cinq groupes morphologiques dont les caractéristiques rappellent celles des genres *Nocardiopsis* (groupe morphologique G1), *Streptomonospora* (G2), *Saccharomonospora* (G3) et *Prauserella* (G4), mais

aussi, celles des genres *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora* (G5). Une taxonomie numérique (ascendante, méthode UPGMA, indice de Sokal et Michener) basée sur une étude physiologique détaillée (63 tests par souche) a permis de son côté de scinder les 91 souches en sept groupes physiologiques ou clusters (I à VII). Chaque cluster représente un groupe morphologique précis, à l'exception du G5 qui a été séparé en trois clusters (I, V et VII). Les études chimiotaxonomiques, basées sur la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique, la présence ou l'absence de la glycine et la présence ou l'absence de sucres caractéristiques (couples arabinose-galactose, arabinose-xylose, rhamnose-galactose ou encore madurose) ont permis de conforter les présomptions quant à l'appartenance des 91 souches aux cinq genres cités auparavant. Ainsi, toutes les souches contiennent l'isomère DL de l'acide diaminopimélique, mais pas de glycine. Les souches des groupes morphologiques G3, G4 et G5 (clusters I, II, V, VI et VII) contiennent de l'arabinose et du galactose comme sucres caractéristiques, contrairement aux souches des groupes G1 (cluster IV) et G2 (cluster III).

Les critères moléculaires, basés sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et les études phylogénétiques, ont permis de confirmer de manière définitive que les souches appartiennent bien aux genres *Nocardiopsis* (G1, cluster IV), *Streptomonospora* (G2, cluster III), *Saccharomonospora* (G3, cluster VI) et *Prauserella* (G4, cluster II), tandis que les souches du groupe G5 (clusters I, V et VII) ont été de leur côté rattachées aux genres *Actinopolyspora* (cluster I), *Saccharopolyspora* (cluster V) et un nouveau genre que l'on a nommé *Mzabimyces* (cluster VII).

Ainsi, sur les 91 souches, 28 appartiennent au genre *Actinopolyspora*, 19 au genre *Saccharomonospora*, 16 au genre *Nocardiopsis*, 13 au genre *Saccharopolyspora*, 7 au genre *Streptomonospora*, 4 au genre *Prauserella* et 4 au genre *Mzabimyces*. Si les cinq premiers genres ont déjà été signalés dans les sols sahariens, à des fréquences tout aussi comparables, c'est la première fois que *Prauserella* est mis en évidence, tandis que *Mzabimyces* est nouveau dans le monde.

Les études phylogénétiques ont permis de constater que certaines souches présentaient des pourcentages de similarité (gène codant pour l'ARNr 16S) relativement bas avec les espèces les plus proches, ce qui pouvait suggérer la probabilité de nouvelles espèces. Ces souches ont fait l'objet d'études chimiotaxonomiques plus approfondies, telles que la recherche des phospholipides, des ménaquinones et des acides gras, ainsi que des études moléculaires, telles que les hybridations ADN-ADN, et également, pour le nouveau genre, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine et la détermination des signatures des nucléotides.

Les quatre souches de *Mzabimyces* se sont révélées appartenir non seulement à un nouveau genre, mais également à une nouvelle famille, appelée *Mzabimycetaceae*, sur la base des signatures des nucléotides. L'hybridation ADN-ADN a montré que l'on est en présence d'une seule espèce qui a été appelée pour la circonstance *Mzabimyces algeriensis*.

Une souche d'*Actinopolyspora* s'est révélée être nouvelle et a été appelée *Actinopolyspora biskrensis*. Deux souches de *Prauserella* sont également originales et ont été appelées *Prauserella isguenensis*. En revanche, quatre souches d'*Actinopolyspora* ont été rattachées, après hybridation ADN-ADN, à une espèce déjà connue, *Actinopolyspora erythrea*.

Cependant, au vu des pourcentages de similarité relativement bas du gène codant pour l'ARNr 16S, et également de la grande diversité physiologique, plusieurs autres souches appartenant aux genres *Nocardiopsis*, *Streptomonospora*, *Prauserella*, *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora* et *Saccharopolyspora* pourraient appartenir également à de nouvelles espèces. Une hybridation ADN-ADN avec les espèces les plus proches devrait à l'avenir nous permettre de statuer sur la position taxonomique de ces souches.

L'étude des potentialités antagonistes des actinobactéries halophiles vis-à-vis de microorganismes (bactéries, levures et champignon filamenteux) dont la plupart sont pathogènes ou toxigènes pour l'homme ou encore phytopathogènes, a montré que 69 souches sur les 91 testées ont une activité antibiotique contre au moins un microorganisme. Les 69 souches actives ont toutes une action antifongique (dont 47 essentiellement antifongique et 22 à la fois antifongique et antibactérienne). Aucune souche n'a une activité dirigée uniquement contre les bactéries. Plusieurs souches ont une activité très forte à appréciable. Un total de 22 souches n'a montré aucune activité antibiotique. Les potentialités de ces 22 souches à produire des molécules bioactives ont été vérifiées par un screening moléculaire par la recherche des gènes codant pour les « polyketides synthetases » (PKS-I, PKS-II et énediynes PKS) et des « non-ribosomal peptides synthetases » (NRPS). Les résultats ont montré que 19 des 22 souches possèdent au moins un type de gène pour la production de molécules bioactives, surtout les PKS-II et les NRPS.

Les perspectives concernant ce travail sont les suivantes:

- Il serait toujours intéressant de continuer à valoriser les sols sahariens par la mise en évidence de nouveaux taxons, en diversifiant les échantillons de sols et aussi les milieux de culture d'isolement.

- Plusieurs souches appartenant aux genres *Nocardiopsis*, *Streptomonospora*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* et *Prauserella* ayant montré un pourcentage de similarité (gène codant pour l'ARNr 16S) relativement bas avec les espèces les plus proches devraient subir le test d'hybridation ADN-ADN pour espérer trouver encore de nouvelles espèces (assez probable).
  
- Il serait intéressant d'étendre la recherche des gènes codant pour les PKS et les NRPS à toutes les souches, et de procéder au séquençage de ces gènes afin d'avoir une idée sur les molécules bioactives produites par ces souches.
  
- Il serait également important de valoriser tout ce potentiel en souches halophiles en étudiant de manière plus approfondie les antibiotiques (surtout pour les souches à spectre d'action intéressant), mais aussi d'autres métabolites, comme par exemple les enzymes, dont l'activité persiste même à de fortes teneurs en NaCl, comme cela pu a être constaté lors des études physiologiques où une grande variabilité a ainsi été obtenue.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



A

Adinarayana G., Venkateshan MR., Bapiraju VV., Sujatha P., Premku-mar J., Ellaiah P., Zeeck A. (2006). Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium. *Bioorg Khim.*, 32:328–334.

Al-Zarban SS., Al-Musallam AA., Abbas IH., Fasasi YA. (2002a). Note worthy salt-loving actinomycetes from Kuwait. *Kuwait J Sci Eng.*, 29:99–109.

Al-Zarban SS., Abbas I., Al Musallam AA., Steiner U., Stackebrandt E., Kroppenstedt RM. (2002b). *Nocardioopsis halotolerans* sp. nov., isolated from salt marsh soil in Kuwait. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52:525–529.

Al-Zarban SS., Al-Musallam AA., Abbas I., Stackebrandt E., Kroppenstedt RM. (2002c). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52:555–8.

Alexander M. (1977). Introduction to soil microbiology. Krieger Publishing Company, Malabar. pp. 467–468.

Al-Mueini R., Al-Dalali M., Al-Amri IS., Patzelt H. (2007). Hydrocarbon degradation at high salinity by a novel extremely halophilic actinomycete. *Environ Chem.*, 4:5–7.

Anisha GS., Prema P. (2006). Selection of optical growth medium for the synthesis of agalactosidase from mangrove actinomycetes. *Indian J Biotech.*, 5:376–379.

Aouar L., Lerat S., Ouffroukh A., Boulahrouf A., Beaulieu C. (2012). Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Can J Plant Pathol.*, 34:165–176.

Aouiche A., Bijani C., Zitouni A., Mathieu F., Sabaou N. (2014). Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* sp. PAL114 isolated from Saharan soil. *J Myc Med.*, 24:17–24.

Aouiche A., Bouras N., Mokrane S., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2015). *Actinokineospora mزابensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107:291–296.

Athalye M., Goodfellow M., Lacey J., White RP. (1985). Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardioopsis*. *Int J Syst Bacteriol.*, 35:86–98.

Ayuso-Sacido A., Genilloud O. (2005). New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb Ecol.*, 49:10–24.

## B

Bacha N. (2009). Caractérisation des polycetones synthases intervenant dans la biosynthese d'ochratoxine A, d'acide penicillique, d'asperlactone et d'isoasperlactone chez *Aspergillus westerdijkiae*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 236 p.

Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2006). Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104, isolated from an Algerian Saharan soil. *Can J Microbiol.*, 52:373–382.

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

Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou KH., Beaulieu C. (2002). Characterization of rhizospheric soil *Streptomyces* from Moroccan habitats, and their antimicrobial activities. *World J Microbiol Biotechnol.*, 18:49–54.

Becker B., Lechevalier MP., Gordon RE, Lechevalier HA. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol.*, 12:421–423.

Becker B., Lechevalier MP., Lechevalier HA. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol.*, 13:236–43.

Bérdy J., Aszalos A., Mc Nitt KL. (1987). *CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. part 1, 2, 3.* Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.

Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.*, 58:1–26.

Borelli D., Middelveen M. (1986). Actinomycetoma caused by *Streptomyces somaliensis*. *Arch Dermatol.*, 122:1097–1098.

- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F, Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013a). *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:549–553.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F, Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013b). *Saccharothrix saharensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:3744–3749.
- Boubetra D., Sabaou N., Zitouni A., Bijani C., Lebrihi A., Mathieu F. (2013c). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res.*, 103:771–776.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2015). *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 65:1316–1320.
- Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P. (2005). Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J Myc Med.*, 15:39–44.
- Boudjelal F., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou S. (2011). Taxonomy and antimicrobial activities of two novel halophilic *Saccharomonospora* strains isolated in Algerian Sahara soils. *Ann Microbiol.*, 61:299–305.
- Boudjelal F. (2012). Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus* sp. AH97. Thèse de Doctorat à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrache, Alger, Algérie. 167 p.
- Boudjelal F., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2015). *Actinoalloteichus hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 65:2006–2010.
- Boudjella H. (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, ENS de Kouba, Alger, Algérie. 177 p.

Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje MC, Sabaou N., Lebrihi A. (2010). Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *J Antibiotics.*, 63:709–711.

Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkhia de Ain Mlila. *Sciences Technologie*, 23:5–10.

Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., Boulahrouf A. (2012). Antibacterial activity of rare *Streptomyces* species against clinical resistant bacteria. *Ann Biol Clin.*, 70:169–74.

Bouras N. (2005). Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 121 p.

Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2008). Precursor directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry.*, 43:1244–1252.

Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2015). *Nocardiopsis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107:313–320.

Brown-Peterson NJ., Salin ML. (1994). Salt stress in a halophilic bacterium: alterations in oxidative metabolism and oxy-intermediate scavenging systems. *Can J Microbiol.*, 40:1057–1063.

Bull AT., Stach JEM. (2005). Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87:65–79.

## C

Cai, M., Tang SK., Chen YG., Li Y., Zhang YQ., Li WJ. (2009). *Streptomonospora amylolytica* sp. nov. and *Streptomonospora flavalba* sp. nov., two novel halophilic actinomycetes isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59:2471–2475.

Chang X., Liu W., Zhang XH. (2011). *Spinactinospora alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 61:2805–2810.

- Chang X., Liu W., Zhang XH. (2012). *Salinactinospora qingdaonensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt pond. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 62:954–959.
- Charan RD., Schlingmann G., Janso J., Bernan V., Feng X., Carter GT. (2004). Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod.*, 67:1431–1433.
- Chargaff E., Vischer E., Doniger R., Green C., Misani F. (1949). The composition of the desoxypentose nucleic acids of thymus and spleen. *J Biol Chem.*, 177:405–416.
- Chen D., Feng J., Huang L., Zhang Q., Wu J., Zhu X., Duan Y., Xu Z. (2014). Identification and characterization of a new erythromycin biosynthetic gene cluster in *Actinopolyspora erythraea* YIM90600, a novel erythronolide producing halophilic actinomycete isolated from Salt Field. *Plos one*, 9:108129.
- Chen YG., Wang YX., Zhang YQ., Tang SK., Liu ZX., Xiao HD., Xu LH., Cui XL., Li WJ. (2009). *Nocardiopsis litoralis* sp. nov., a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59:2708–2713.
- Cheng J., Zhang YG., Chen W., Li L., Zhang DF., Wang HF., Lu XH., Duan YQ., Li WJ. (2013). *Saccharopolyspora cavernae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Swallow Cave in Yunnan, south-west China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104:837–43.
- Chun J., Bae KS., Moon EY., Jung SO., Lee HK., Kim SJ. (2000). *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 50:1909–1913.
- Collins MD., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin DE. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol.*, 100:221–230.
- Collins MD., Shah HN., Minnikin DE. (1980). A note on the separation of natural mixtures of bacterial menaquinones using reverse-phase partition thin layer chromatography. *J Appl Bacteriol.*, 48:277–282.
- Collins MD. (1985). Isoprenoid quinone analysis in bacterial classification and identification. In: *Chemical methods in bacterial systematic*. Goodfellow M. and Minnikin D. E. (Eds). Society for Applied Bacteriology, Technical Series no. 20. Academic press. London. pp. 267-287.

Courtenay ES., Capp MW., Anderson CF., Record MT. (2000). Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of osmotic stress experiment in vitro. *Biochemistry*, 39:4456–4471.

Cui, XL., Mao PH., Zeng M., Li WJ., Zhang LP., Xu LH., Jiang CL. (2001). *Streptomonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 51:357–363.

Cui XL. (2012). Genus III. *Streptomonospora* Cui *et al.* 2001. In Goodfellow *et al.* (Editors). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, vol. V. The *Actinobacteria*, part B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer. pp. 1908–1914.

## D, E

DasSarma S., Arora P. (2001). A general review on Halophiles. *Encyclopedia of life sciences.*, 1–9.

De Lagarde J. (1983). *Initiation à l'analyse des données*. Bordas, Paris. 157 p.

De Ley J., Cattoir H., Reynaerts A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem.*, 12:133–142.

Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M., Puglia AM. (2002). Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J Biotechnol.*, 99:187–198.

Driche EH., Belghit S., Bijani C., Zitouni A., Sabaou N., Mathieu F., Badji B. (2015). A new *Streptomyces* strain isolated from Saharan soil produces di-(2-ethylhexyl) phthalate, a metabolite active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Microbiol.*, 65:1341–1350.

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

## F

Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol.*, 17:368–76.

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

Fitch WM. (1972). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool.*, 20:406–416.

Fitch WM. (1977). On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am Nat.*, 111:223–257.

Fitter AH., Hay PKH. (1987). *Environmental physiology of plants*. Academic Press, London. pp. 226–259.

## G

Garrity GM., Bell JA., Lilburn TG. (2004). Taxonomic Outline of the Procaryotes, Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology. Second Edition Release 5.0, Springer-Verlag, New York. pp 1–399.

Gazenko SV., Reponen TA., Grinshpun SA., Willeke K. (1998). Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl Environ Microbiol.*, 64:4410–4415.

Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J., Vicente F. (2010). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38:375–89.

Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J., Vicente F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 38:375–389.

George M., Anjumol A., George G., Mohamed Hatha AA. (2012). Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *Afr J Microbiol Res.*, 6:2265–2271.

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

Ghanem NB., Mabrouk ME., Sabry SA., El-Badan DE. (2005). Degradation of polyesters by a novel marine *Nocardiopsis aegyptia* sp. nov.: application of Plackett-Burman experimental design for the improvement of PHB depolymerase activity. *J Gen Appl Microbiol.*, 51:151–158.

Gochnauer MB., Leppard GG., Komaratat P., Kates M., Novitsky T., Kushner DJ. (1975). Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol.*, 21:1500–1511.

- Gontang EA., Gaudêncio PS., Fenical W., Jensen PR. (2010). Sequence based analysis of secondary metabolite biosynthesis in marine actinobacteria. *Appl Environ Microbiol.*, 76:2487–2499.
- Goodfellow M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J Gen Microbiol.*, 69:33–90.
- Goodfellow M., Alderson G. (1977). The actinomycetes genus *Rhodococcus*: a home for the "rhodochrous" complex. *J Gen Microbiol.*, 100:99–122.
- Goodfellow M., Pirouz T. (1982). Numerical classification of sporoactinomycetes containing meso-diaminopimelic acid in the cell wall. *J Gen Microbiol.*, 128:503–527.
- Goodfellow M., Williams ST. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol.*, 37:189–216.
- Goodfellow M., Mordarski M., Williams ST. (1988). The biology of the actinomycetes. Academic Press, London. pp. 7–164.
- Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: Goodfellow *et al.* (Editors). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria*, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. pp. 1–28.
- Goodfellow M., Kämpfer P., Busse HJ., Trujillo ME., Suzuki, K., Ludwig W., Withman WB. (2012). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria* (2<sup>ème</sup> Eds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 2083 p.
- Goodfellow M., Trujillo ME. (2012) Family I. *Actinopolysporaceae*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB (Eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. pp 163–170.
- Gordon RE., Barnett DA., Handerhan JE., Pang CHN. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol.*, 24:54–63.
- Gordon RE., Barnett DA. (1977). Resistance to rifampicin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomic tool. *Int J Syst Bacteriol.*, 27:176–178.
- Gottlieb D., (1973). General considerations and implications of the actinomycetes. In: *Actinomycetales: Characteristics and practical importance*. Sakes G., Skinner FA. (Eds). Academic Press, New York. pp.1–10.



- Goudjal Y., Toumatia O, Sabaou N., Barakate M., Mathieu F., Zitouni A. (2013a). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World J Microbiol Biotechnol.*, 29:1821–1829.
- Goudjal Y., Toumatia O, Yekkour A., Sabaou N., Mathieu F., Zitouni A. (2013b). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiol Res.*, 169:59–65.
- Grant WD. (2004). Life at low water activity. *Phil Trans R Soc Lond B.*, 359:1249–1267.
- Greiner-Mai E., Korn-Wendisch F., Kutzner HJ. (1988). Taxonomic revision of the genus *Saccharomonospora* and description of *Saccharomonospora glauca* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 38:398–405.
- Grund E., Kroppenstedt RM. (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardioopsis* Meyer 1976. *Int J Syst Bacteriol.*, 40:5–11.
- Guan TW., Tang SK., Wu JY., Zhi XY., Xu LH., Zhang LL., Li WJ. (2009). *Haloglycomyces albus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, filamentous actinomycete of the family *Glycomycetaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59:1297–1301.
- Guan TW., Liu Y., Zhao K., Xia ZF., Zhang XP., Zhang LL. (2010). *Actinopolyspora xinjiangensis* sp. nov., a novel extremely halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98:447–453.
- Guan TW., Wu N., Xia ZF., Ruan JS., Zhang XP., Huang Y., Zhang LL. (2011). *Saccharopolyspora lacisalsi* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Extremophiles.*, 15:373–378.
- Guan TW., Wei B., Zhang Y., Xia ZF., Che ZM., Chen XG., Zhang LL. (2013a). *Actinopolyspora lacussalsi* sp. nov., a novel extremely halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:3009–3013.
- Guan TW., Zhao HP., Che ZM., Zhang XP., Zhang LL. (2013b). *Actinopolyspora dayingensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a hypersaline lake. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104:787–792.

## H

Hacène H., Sabaou N., Bounaga N., Lefebvre G. (1994). Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare *Actinomycetales*. *Microbios.*, 79:81–85.

Hamedi J., Mohammadipanah F., Von JM., Pötter G., Spröer C., Klenk HP., Kroppenstedt RM. (2010). *Nocardiopsis sinuspersici* sp. nov., isolated from the sandy soil of Iran. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 60:2346–2352.

Hamedi J., Mohammadipanah F., Pötter G., Spröer C., Schumann P., Göker M., Klenk HP. (2011). *Nocardiopsis arvandica* sp. nov., isolated from sandy soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 61:1189–1194.

Hamedi J., Mohammadipanah F., Ventosa A. (2013). Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles*, 17:1–13.

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

Hayakawa M., Nonomura H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferm Technol.*, 65:501–509.

He H., Ding WD., Bernan VS., Richardson AD., Ireland CM., Greenstein M., Ellestad GA., Carter GT. (2001). Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaivitiensis*. *J Am Chem Soc.*, 123:5362–5363.

Hermans L., Gossele F., Biot A. (1989). Fermentations industrielles. In: Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J. P. and Sanglier J. J. (Eds). Masson, Paris. pp.342–380.

Hiramatsu A., Ouchi T. (1963). On the proteolytic enzymes from the commercial protease preparation of *Streptomyces griseus* (Pronase P). *J Biochem.*, 54:462–464.

Hoffman GJ., Ayers RS., Doering EJ., McNeal BL. (1980). Salinity in irrigated agriculture. In: Design and operation of farm irrigation systems. Jensen M. E. (Eds). American Society of Agricultural Engineering, St. Joseph, Michigan. pp.145–185.

Hozzein WN., Goodfellow M. (2011). *Actinopolyspora egyptensis* sp. nov., a new halophilic actinomycete. *Afr J Microbiol Res.*, 5:100–105.

Hozzein WN., Trujillo ME. (2012). Genus I. *Nocardiopsis* Meyer 1976. In Goodfellow *et al.* (Editors). Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, vol. V. The Actinobacteria, part B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer. pp.1891–1906.

Huang SX., Zhao LX., Tang SK., Jiang CL., Duan Y., Shen B. (2009). Erythronolides H and I, new Erythromycin congeners from a new halophilic actinomycete *Actinopolyspora* sp. YIM90600. *Org letters.*, 11:1353–1356.

Huss VAR., Festl H., Schleifer KH. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol.*, 4:184–192.

Huttner A., Harbarth S., Carlet J., Cosgrove S., Goossens H., Holmes A., Jarlier V., Voss A., Pittet D. (2013). Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrob Res Infect Control.*, 2:1–13.

## I

Imada C. (2005). Enzyme inhibitors and other bioactive compound from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 587:59–63.

Inahashi Y., Matsumoto A., Danbara H., Ōmura S., Takahashi Y. (2010). *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete of the family *Micromonosporaceae* isolated from plant roots. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 60:2652–2658.

Iwai Y., Omura S. (1982). Culture conditions for screening of new antibiotics. *J Antibiot.*, 35:123–141.

## J

Janso JE., Carter GT. (2010). Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Appl Environ Microbiol.*, 76:4377–4386.

Jensen PR., Dwight R., Fenical W. (1991). Distribution of actinomycetes in nearshore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol.*, 57:1102–1108.

Johnson KG., Lanthier PH., Gochnauer MB. (1986). Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Arch Microbiol.*, 143:370–378.

Juguet M., Lautru S., Gondry M., Pernodet JL. (2008). Isolement et caractérisation du groupe de gènes dirigeant la bisynthèse de la congocidine chez *Streptomyces ambofaciens*. Journées francophones des actinomycètes, Castan et-Tolosan, France.

Jukes TH., Cantor CR. (1969). Evolution of protein molecules. In: Mammalian protein metabolism. Munro H.N. (Eds). Vol. 3. Academic Press, New York. pp. 21–132.

## K

Kämpfer P. (2010). *Actinobacteria*. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology Part 19, 1819–1838.

Kämpfer P. (2012). Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In Goodfellow *et al.* (Editors). Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, vol. V. The Actinobacteria, part B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer. pp. 1455–1767.

Katz L., Donadio S. (1993). Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Ann Rev Microbiol.*, 47:875–912.

Kelly KL., Judd DB. (1976). Color Universal language and dictionary of names. National Bureau of Standards Special Publication 440. U.S. Department of Commerce, Washington D.C.

Kerker S. (2004). Ecology of hypersaline microorganisms In: Ramaiah N (Ed) Marine microbiology: facets and opportunities. National Institute of Oceanography, Goa. pp. 37–47.

Khosla C., Gokhale RS., Jacobsen JR., Cane D E. (1999). Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu Rev Biochem.*, 68:219–253.

Kim SB., Goodfellow M. (1999). Reclassification of *Amycolatopsis rugosa* Lechevalier *et al.* 1986 as *Prauserella rugosa* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 2:507–12.

Kim SB. (2012). Genus XIII. *Saccharomonospora* Nonomura and Ohara 1971. In Goodfellow *et al.* (Editors). Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, vol. V. The Actinobacteria, part B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer. pp. 1390–1396.

Kim OS., Cho YJ., Lee K., Yoon SH., Kim M., Na H., Park SC., Jeon YS., Lee JH., Yi H., Won S., Chun J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 62:716–721.

Kim SB., Goodfellow M. (2012a). Genus XII. *Prauserella* Kim and Goodfellow 1999. In Goodfellow *et al.* (Editors). Bergey Manual of Systematic Bacteriology, vol. V. The Actinobacteria, part B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer. pp. 1384–1390.

Kim SB., Goodfellow M. (2012b). Genus XII. *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975. In Goodfellow *et al.* (Editors). Bergey Manual of Systematic Bacteriology, vol. V. The Actinobacteria, part B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer. pp. 1396–1414.

Kim M., Oh HS., Park SC., Chun J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 64:346–351.

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

Kirst HA., Michel KH., Mynderse JS., Chio EH., Yao RC., Nakatsukasa WM., Boeck LD., Ocolowitz JL., Paschal JW., Deeter JB., Thompson GD. (1992). Discovery, isolation, and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides. In: Baker DR., Fenyves JG, Steffens JJ (Eds) *Synthesis and chemistry of agrochemicals III*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 214–225.

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

Kleinkauf H., Doehren HV. (1996). A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem.*, 236:335–351.

Koehn FE., Carter GT. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 4:206–220.

Kokare CR., Mahadik KR., Kadam SS., Chopade BA. (2004). Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. *Curr Sci.*, 86:593–597.

Kroppenstedt RM. (1982). Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase (RP18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases. *J Liq Chromatogr.*, 5:2359–2367.

Kroppenstedt RM. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Chemical methods in bacterial systematics. Goodfellow M. and Minnikin DE., (Eds). Academic Press, London. pp. 173–199.

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

Kroppenstedt RM. (1992). The genus *Nocardiopsis*. In: The Prokaryotes (2nd Eds) Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York, Springer. pp.1139–1156.

Kroppenstedt RM., Eventushenko LI. (2006). The Family *Nocardiopsaceae*. Prokaryotes, 3:754–795.

Kundu S., Sahu MK., Sivakumar K., Kannan L. (2006). Occurrence of antagonistically active extracellular enzyme producing actinomycetes in the alimentary canal of estuarine fishes. Asian J Microbiol Biotech Environ Sci., 8:707–710.

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

Kwon HC., Kauffman CA., Jensen PR., Fenical W. (2006). Marinomycins A-D, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinispora*. J Am Chem Soc., 128:1622–1632.

## L

Labeda DP., Testa RT., Lechevalier MP., Lechevalier HA. (1984). *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiopsis*. Int J Syst Bacteriol., 34:426–431.

Labeda DP., Lechevalier MP. (1989). Amendment of the genus *Saccharothrix* Labeda *et al.* 1984 and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. Int J Syst Bacteriol., 39:420–423.

Labeda DP., Kroppenstedt RM. (2007). Proposal of *Umezawaea* gen. nov., a new genus of the *Actinosynnemataceae* related to *Saccharothrix*, and transfer of *Saccharothrix tangerines* Kinoshita *et al.* 2000 as *Umezawaea tangerina* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol., 57:2758–61.

- Labeda DP. (2012). Genus XV. *Saccharothrix* Labeda *et al.* 2001. In Goodfellow *et al.* (Editors). Bergey Manual of Systematic Bacteriology, vol. V. The Actinobacteria, part B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer. pp. 1415–1419.
- Labeda DP., Goodfellow M. (2012). Family I. *Pseudonocardiaceae*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (Eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. pp. 1302–1445.
- Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. Soc Appl Bacteriol Symp Ser., 2:231–51.
- Lamari L (2006) Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat à Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie. 186 p.
- Lamari L., Boudjella H., Bouras N., Sabaou N. (2015). Etude comparative des actinobactéries de la rhizosphère de deux cultivars de palmier dattier sensible et résistant au bayoud. Algerian Journal of Arid Environment., 3:3–17.
- Larpen JP., Larpen-Gourgaud M. (1985). Éléments de Microbiologie. Hermann Paris. 264 p.
- Larsen H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms. An overview and historical perspective. FEMS Microbiol Lett., 39:3–7.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek, 78:399–405.
- Lechevalier HA., Lechevalier MP. (1970). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: The *Actinomycetales*. Prauser H. (Eds). G. Fisher Verlag, Jena. pp. 393–405.
- Lechevalier, MP., Bievre, CD., Lechevalier H. (1977). Chemotaxonomie of aerobic Actinomycetes: phospholipides composition. Bioch Syst Ecol., 5:249–260.
- Lechevalier MP., Lechevalier HA. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In: microbiology thayer, Actinomycete taxonomy. Eds: A.Dietz, D.W. Society for industrial SIM special publication number 6. Arlington, Virginia USA. pp. 225–291.

- Lechevalier HA., Lechevalier MP. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: The prokaryotes, Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1915–1922.
- Lechevalier MP., Prauser H., Labeda DP., Ruan JS. (1986). Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 36:29–37.
- Li F., Maskey RP., Qin S., Sattler I., Fiebig HH., Maier A., Zeeck A., Laatsch H. (2005). Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. Isolate M045. *J Nat Prod.*, 68:349–35.
- Li WJ., Tang SK., Stackebrandt E., Kroppenstedt RM., Schumann P., Xu LH., Jiang CL. (2003a). *Saccharomonospora paurometabolica* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from soil in China. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 53:1591–1594.
- Li WJ., Xu P., Tang SK., Xu LH., Kroppenstedt RM., Stackebrandt E., Jiang CL. (2003b). *Prauserella halophila* sp. nov. and *Prauserella alba* sp. nov., moderately halophilic actinomycetes from saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 53:1545–1549.
- Li WJ., Xu P., Zhang LP., Tang SK., Cui XL., Mao PH., Xu LH., Schumann P., Stackebrandt E., Jiang CL. (2003c). *Streptomonospora alba* sp. nov., a novel halophilic actinomycete, and emended description of the genus *Streptomonospora* Cui et al. 2001. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 53:1421–1425.
- Li WJ., Kroppenstedt RM., Wang D., Tang SK., Lee JC., Park DJ., Kim CJ., Xu LH., Jiang CL. (2006). Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56:1089–1096.
- Li X., Huang Y., Whitman WB. (2015). The relationship of the whole genome sequence identity to DNA hybridization varies between genera of prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107:241–249.
- Li Y., Tang SK., Chen YG., Wu JY., Zhi XY., Zhang YQ., Li WJ. (2009). *Prauserella salsuginis* sp. nov., *Prauserella flava* sp. nov., *Prauserella aidingensis* sp. nov. and *Prauserella sediminis* sp. nov., isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2923–2928.



Lindholm P., Kortemaa H., Kokkola M., Haahtela K., Salkinoja-Salonen M., Valkonen JPT. (1997). *Streptomyces* spp. Isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. Plant Dis., 81:1317–1322.

Liu D., Coloe S., Baird R., Pedersen J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. J Clin Microbiol., 38:471.

Liu Z., Li Y., Zheng LQ., Huang YJ., Li WJ. (2010). *Saccharomonospora marina* sp. nov., isolated from an ocean sediment of the East China Sea. Int J Syst Evol Microbiol 60:1854–1857.

Liu M., Zhang L., Ren B., Yang N., Yu X., Wang J., Ding L., Liu X., Liu Z., Goodfellow M., Zhang L. (2014). *Prauserella shujinwangii* sp. nov., a new member of the genus *Prauserella* isolated from Xinjiang region, China. Int J Syst Evol Microbiol., 64:3833–3837.

Locci R. (1989). *Streptomyces* and related genera. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins. pp. 2451–2493.

Locci R. (1994). Actinomycetes as plant pathogens. Eur J Plant Pathol., 100:179–200.

Lombo F., Velasco A., de la Calle F., Brana AF., Sanchez-Pulles JM., Mendez C., Salas JA. (2006). Deciphering the biosynthesis of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. Chem Bio Chem., 7:366–376.

Lv LL., Zhang YF., Xia ZF., Zhang JJ., Zhang LL. (2014). *Saccharopolyspora halotolerans* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a hypersaline lake. Int J Syst Evol Microbiol., 64:3532–3537.

## M

Madern D., Ebel C., Zaccari G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles, 4:91–98.

Magarvey NA., Haltli B., He M., Greenstein M., Hucul JA. (2006). Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drugs resistant Gram positive pathogens. Antimicrob Agents Chemother., 50:2167–2177.

Mahyudin NA., Blunt JW., Cole ALJ., Munro MHG. (2012). The isolation of a new S-methyl benzothioate compound from a marine derived *Streptomyces* sp. J Biomed Biotechnol., doi:10.1155/2012/894708

- Manju KG., Dhevendaran K. (1997). Effect of bacteria and actinomycetes as single cell protein feed on growth of juveniles of *Macrobrachium idella* (Hilgendorf). *Indian J Exp Biol.*, 35:53–55.
- Mann J. (2001). Natural products as immunosuppressive agents. *Nat Prod Rep.*, 18:417–430.
- Mao J., Wang J., Dai HQ., Zhang ZD., Tang QY., Ren B., Yang N., Goodfellow M., Zhang LX., Liu ZH. (2011). *Yuhushiella deserti* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder *Pseudonocardineae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61:621–30.
- Marchal N., Bourdon JL. (1973). Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds). Paris. 179 p.
- Marchal N., Bourdon JL., Richard Cl. (1987). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin editor. Paris pp. 67–122.
- Mariat F., Sebald M. (1990). Les actinomycetes. Dans: Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France
- Maskey RP., Li FC., Qin S., Fiebig HH., Laatsch H. (2003a). Chandrananimycins A-C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *J Antibiot.*, 56:622–629.
- Maskey RP., Helmke E., Laastsch H. (2003b). Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. *J Antibiot.*, 56:942–949.
- McNeil MM., Brown JM. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev.*, 7:357–417.
- Meier-Kolthoff JP., Göker M., Spröer C., Klenk HP. (2013). When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy. *Arch Microbiol.*, 195:413–418.
- Meklat A. (2012). Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie. 162 p.
- Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F., Ahmed Lebrihi. (2011). Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in saharan soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol.*, 77: 6710–6714.

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F, Lebrihi A., Schumann, P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2012a). *Actinopolyspora algeriensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil. *Extremophiles*, 16:771–776.

Meklat A., Sabaou N., Bouras N., Zitouni A., Spröer C., Klenk HP., Mathieu F., Lebrihi A. (2012b). A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil. *Ann Microbiol.*, 62:1049–1057.

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F, Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013a). *Actinopolyspora saharensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103:771–776.

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F, Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013b). *Actinopolyspora righensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104:301–307.

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F, Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013c). *Actinopolyspora mzabensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil of Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:3787–3792.

Meklat A., Bouras N., Riba A., Zitouni A., Mathieu F, Rhode M., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2014a). *Streptomonospora algeriensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from soil in Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106:287–292.

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Sabaou N., Mathieu F, Schumann P., Spröer C., Klenk HP. (2014b). *Saccharopolyspora ghardaiensis* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *J Antibiotics.*, 67:299–303.

Meklat A., Bouras N., Mokrane S., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2015). *Bounagaea algeriensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic actinobacterium isolated from a Saharan soil of Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108:473–82.

Merck E. (1975). *Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier*. Darmstadt. 149 p.

Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje MC., Sabaou N., Lebrihi A. (2010). Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Products.*, 73:1164–1166.

- Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2011). New dithiolopyrrolones antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. FEMS Microbiol Lett., 318:41–46.
- Metsä-Ketelä M., Salo V., Halo L., Hautala A., Hakala J., Mäntsälä P., Ylihonko K. (1999). An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. FEMS Microbiol Lett., 180:1–6.
- Meyer J. (1976). *Nocardiopsis* a new genus of the order *Actinomycetales*. Int J Syst Bacteriol., 26:487–493.
- Minnikin DE., Hutchinson IG., Caldicott AB. (1980). Thin layer chromatography of methanolysates of mycolic acid containing bacteria. J Chromatogr., 188:224–233.
- Minnikin DE., O'Donnell AG. (1984). Actinomycete envelope lipid and peptidoglycan composition. In: The Biology of the Actinomycetes. Goodfellow M., Mordarski M. and Williams S. T. (Eds). Academic Press. London. pp. 337–388.
- Moncheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S., Bogatzevska N. (2002). Characteristics of soil actinomycetes from antarctica. Journal of Culture Collections., 3:3–14.
- Moore CV. (1984). An economic analysis of plant improvement strategies for saline conditions. In: Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement. Stalpes R. C. (Eds). John Wiley. New York. pp. 381–397.
- Mootz HD., Schwarzer D., Marahiel MA. (2002). Ways of assembling complex natural products on modular non-ribosomal peptide synthetases. Chem Bio Chem., 3:490–504.
- Mordarska H., Mordarska M., Goodfellow M. (1972). Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. J Gen Microbiol., 71:77–86.
- Murphy BT., Narender T., Kauffman CA., Woolery M., Jensen PR., Fenical W. (2010). Saliniquinones A-F, new members of the highly cytotoxic anthraquinone-c-pyrone from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. Aust J Chem., 63:929–934.
- Murugan M., Srinivasan M., Sivakumar K., Sahu MK., Kannan L. (2007). Characterization of an actinomycete isolated from the estuarine finfish, *Mugil cephalus* Lin. (1758) and its optimization for cellulase production. J Sci Ind Res India., 6:388–393.

## N

Naidenova M., Vladimirova D. (2002). Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in Bulgaria. *Journal of Culture Collections*, 3:15–24.

Nieto JJ., Vargas C. (2002). Synthesis of osmoprotectants by moderately halophilic bacteria: genetic and applied aspects. In: Pandalai SG (ed) *Recent Res Devel Microbiol. Research Signpost, Kerala*. pp. 403–418

Nolan RD., Cross T. (1988). Isolation and screening of actinomycetes, In: *Actinomycetes in biotechnology*. Goodfellow M., Williams S. T. and Mordarski M. (Eds). Academic Press, Inc., San Diego, Calif. pp. 1–32.

Nonomura H., Ohara Y. (1969). Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil. *J Ferment Technol.*, 47:463–469.

Nonomura H., Ohara Y. (1971). Distribution of actinomycetes in soil. XI. Some new species of the genus *Actinomadura* Lechevalier and Lechevalier. *J Ferment Technol.*, 49:904–912.

## O

Oesterhelt D. (1995). Structure and function of halorhodopsin. *Isr J Chem.*, 35:475–494.

Oh DC., Williams PG., Kauffman CA., Jensen PR., Fenical W. (2006). Cyanosporasides A and B, chloro- and cyano-cyclo-penta[a]indene glycosides from the marine actinomycete “*Salinispora pacifica*”. *Org Lett.*, 8:1021–1024.

Okami Y., Hotta K. (1988). Search and discovery of antibiotics. In: *Actinomycetes in biotechnology*. Goodfellow M., Williams S. T. and Mordarski M. (Eds.) London. Academic Press. pp. 33–67.

Olano C., Lombo F., Méndez C., Salas JA. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering.*, 10:281–92.

Onishi H., Kamekura M. (1972). *Micrococcus halobius* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 22:233–236.

Orchard VA., Goodfellow M. (1980). Numerical classification of some named strains of *Nocardia asteroides* and related isolates from soil. *J Gen Microbiol.*, 118:295–312.

Oren A. (1999). Bioenergetic aspect of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 63:334–348.

Oren, A. (2001). The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 466:61–72.

Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 28:56–63.

Ouhdouch Y., Barakate M., Finance C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *Eur J Biol.*, 37:69–74.

## P

Pan E., Jamison M., Yousufuddin M., MacMillan JB. (2012). Ammosamide D, an oxidatively ring opened ammosamide analog from a marine-derived *Streptomyces variabilis*. *Org Lett.*, 14:2390–2393.

Pathom-aree W., Ward AC., Horikoshi K., Bull AT., Goodfellow M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from the Challenger Deep sediment (10898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10:181–189.

Payne DJ., Gwynn MN., Holmes DJ., Pompliano DL. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 6:29–40.

Phadatare SU., Deshpande VV., Srinivasan MC. (1993). High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme Microb Technol.*, 15:72–76.

Phoebe CH., Combie J., Albert FG., Tran KV., Cabrera J., Correia HJ., Guo Y., Lindermuth J., Rauert N., Galbraith W., Selitrennikoff CP. (2001). Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *J Antibiot.*, 54:56–65.

Pirouz T., Karbasian M.A., Goodfellow M. (1999). Isolation of some aerobic actinomycetes species from the soil of Zahedan County, South-East of Iran. *Irn J Med Sci.*, 24:65–67.

Prashanthi K., Varalakshmi KN., (2015). In vitro cytotoxic and antibacterial potentials of extracts from three marine isolates of actinomycetes isolated from coastal ecosystems of Tanur, Kerala, India. *Bangladesh J Pharmacol.*, 10:57–62.

Prescott LM., Harley JP., Klein DA. (2007). Microbiologie. De Boek and Larcier, Bruxelles. pp. 805–825.

Pridham TG., Tresner HD. (1974). Family VII. *Streptomycetaceae* Waksman and Henrici. In : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 747–845.

## Q, R

Qin S., Li J., Chen HH., Zhao GZ., Zhu WY., Jiang CL., Xu LH., Li WJ. (2009). Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol.*, 75:6176–6186.

Riedlinger J., Reicke A., Zahner H., Krismer B., Bull AT., Maldonado LA., Ward AC., Goodfellow M., Bister B., Bischoff D. (2004). Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. *J Antibiot.*, 57:271–279.

## S

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

Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G., Germain P. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, 9 :147–153.

Sahu MK., Sivakumar K., Kannan L. (2007a). Alkaline protease production by an actinomycete isolated from tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). *Nat Acad Sci Lett.*, 30:61–65.

Sahu MK., Sivakumar K., Poorani E., Thangaradjou T., Kannan L. (2007b). Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. *J Environ Biol.*, 28:465–474.

Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, 4:406–425.

Saker R., Bouras N., Zitouni A., Ghoul M., Rohde M., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2014). *Mzabimyces algeriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinobacterium

isolated from a Saharan soil, and proposal of *Mzabimycetaceae* fam. nov. Antonie van Leeuwenhoek, 106:1021–1030.

Saker R., Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Rohde M., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2015a). Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. *Ann Microbiol.*, in press, DOI 10.1007/s13213-015-1065-6.

Saker R., Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2015b). *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from northern Sahara. *Curr Microbiol.*, 70:423–428.

Saker R., Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2015c). *Prauserella isguenensis* sp. nov., a halophilic; actinomycete isolated from desert soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 65:1598–1603.

Sarkar S., Saha S., Debashis R. (2008). Enhanced production of antimicrobial compounds by three salt-tolerant actinobacterial strains isolated from the sundarbans in a niche-mimic bioreactor. *Mar Biotechnol.*, 10:518–526.

Sasser M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101. MIDI Inc., Newark

Schippers A., Bosecker K., Willscher S., Spröer C., Schumann P., Kroppenstedt RM. (2002). *Nocardiopsis metallicus* sp. nov., a metal leaching actinomycete isolated from an alkaline slag dump. *Int J Syst Bacteriol.*, 52:2291–2295.

Schwarzer D., Marahiel MA. (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 88:93–101.

Senthilkumar S., Sivakumar K., Kannan L. (2005). Mercury resistant halophilic actinomycetes from the salt marsh environment of the Vellar estuary, Southeast coast of India. *J Aqua Biol.*, 20:141–145.

Serrano R., Gaxiola R. (1994). Microbial model and salt stress tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci.*, 13:121–138.

Shannon MC. (1984). Breeding, selection and the genetics of salt. In: *Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement*. Stalpes R. C. (Eds). John Wiley, New York. pp. 231–254.



Sharma SL., Pant A. (2001). Crude oil degradation by marine actinomycete *Rhodococcus* sp. Indian J Mar Sci., 30:146–150.

Shirling EB., Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol., 16:313–340.

Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M., Inouye S., Niida T. (1979). Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. J Antibiot., 32:427–435.

Sierra G. (1957). A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek, 23:15–22.

Singh LS., Baruah I., Bora TC. (2006). Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. Biotechnology, 5:217–221.

Sivakumar K., Sahu MK., Manivel PR., Kannan L. (2006). Studies on L-glutaminase producing actinomycetes strain LG-10 from the estuarine fish, *Chanos chanos* (Forsk., 1775). Indian J Exp Biol., 44:256–258.

Smith DJ., Burnham MK., Bull JH., Hodgson JE., Ward JM., Browne P., Brown J., Barton B., Earl AJ., Turner G. (1990). Beta-lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. EMBO J., 9:741–747.

Sneath PHA. (1957). The application of computers to taxonomy. J Gen Microbiol. 17:201–226.

Sneath PHA. (1989). Numerical taxonomy. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4. Williams S. T., Sharpe M. E. and Holt J. G. (Eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 2303–2305.

Solanki R., Kahanna M. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. Indian J Microbiol., 48:410–431.

Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. Cent Eur J Biol., 7:373–390.

- Song L., Li WJ., Wang QL., Chen GZ., Zhang YS., Xu LH. (2005). *Jiangella gansuensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from a desert soil in north-west China. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 55:881–884.
- Sonya HM., Galal AM. (2005). Identification and antiviral activities of some halotolerant *Streptomyces* isolated from Qaroon lake. *Int J Agri Biol.*, 7:747–757.
- Stackebrandt E., Winner-Fussl B., Fowler VJ., Schillfer KH. (1981). Deoxyribonucleic acid homologies and ribosomal ribonucleic acid similarities among spore forming members of the order Actinomycetales. *Int Syst Bacteriol.*, 31:420–431.
- Stackebrandt E., Kroppenstedt RM., Fowler VJ. (1983). A phylogenetic analysis of the family Dermatophilaceae. *J Gen Microbiol.*, 129:1831–1838.
- Stackebrandt E., Goebel BM. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.*, 44:846–849.
- Stackebrandt E., Kroppenstedt RM., Jahnke KD., Kemmerling C., Qurther H. (1994). Transfer of *Streptosporangium viridogriseum* (Okuda *et al.* 1966), *Streptosporangium viridogriseum* subsp. *kofuensis* (Nonomura, Ohara, 1969), *Streptosporangium albidum* (Furumal *et al.* 1968) to *Kutzneria* gen. nov. as *Kutzneria viridogrisea* comb. nov., *Kutzneria kofuensis* comb. nov., *Kutzneria albida* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Streptosporangium*. *Int J Syst Bacteriol.*, 44:265–269.
- Stackebrandt E., Rainey FA., Ward-Rainey NL. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 47:479–491.
- Stanek JL., Roberts GD. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thinlayer chromatography. *Appl Microbiol.*, 28:226–231.
- Sujatha P., Bapi Raju KV., Ramana T. (2005.) Studies on a new marine *Streptomyces* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res.*, 160:119–126.
- Suthindhiran K., Kannabiran K. (2009a). Hemolytic activity of *Streptomyces* VITSDK1 spp. isolated from marine sediments in Southern India. *J Myc Med.*, 19:77–86.

Suthindhiran K., Kannabiran K. (2009b). Cytotoxic and antimicrobial potential of actinomycete species *Saccharopolyspora salina* VITSDK4 isolated from the Bay of Bengal Coast of India. *Americ J Infec Dis.*, 5:90–98.

Syed DG., Tang SK., Cai M., Zhi XY., Agasar D., Lee JC., Kim CJ., Jiang CL., Xu LH., Li WJ. (2008). *Saccharomonospora saliphila* sp. nov., a halophilic actinomycete from an Indian soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 58:570–573.

## T

Takahashi Y., Omura S. (2003). Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol.*, 49:141–154.

Tan GYA., Goodfellow M. (2012). Genus V. *Amycolatopsis* Lechevalier et al. 1975. In Goodfellow et al. (Editors). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, vol. V. The Actinobacteria, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer. pp. 1334–1358.

Tang SK., Tian XP., Zhi XY., Cai M., Wu JY., Yang LL., Xu LH., Li WJ. (2008). *Haloactinospora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family *Nocardiopsaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 58:2075–2080.

Tang SK., Wang Y., Cai M., Zhi XY., Lou K., Xu LH., Jiang CL., Li WJ. (2009a). *Saccharopolyspora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a saline lake in China. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59:555–558.

Tang SK., Wang Y., Wu JY., Cao LL., Lou K., Xu LH., Jiang CL., Wen JL. (2009b). *Saccharopolyspora qijiaojingensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59:2166–2170.

Tang SK., Wang Y., Guan TW., Lee JC., Kim CJ., Li WJ. (2010a). *Amycolatopsis halophila* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 60:1073–1078.

Tang SK., Wang Y., Zhang H., Lee JC., Lou K., Kim CJ., Li WJ. (2010b). *Haloechinothrix alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic, filamentous actinomycete of the suborder *Pseudonocardineae*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 60:2154–2158.

Tang SK., Zhi XY., Wang Y., Shi R., Lou K., Xu LH., Li WJ. (2011a). *Haloactinopolyspora alba* gen. nov. sp. nov., a novel halophilic filamentous actinomycete isolated from a salt lake in China,

with proposal of *Jiangellaceae* fam. nov. and *Jiangellineae* subord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 61:194–200.

Tang SK., Wang Y., Klenk HP., Shi R., Lou K., Zhang YJ., Chen C., Ruan JS., Li WJ. (2011b). *Actinopolyspora alba* sp. nov. and *Actinopolyspora erythraea* sp. nov., isolated from a salt field in China, and reclassification of *Actinopolyspora iraqiensis* AS 4.1193<sup>T</sup> (Ruan et al. 1994) as a later heterotypic synonym of *Saccharomonospora halophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 61:1693–1698.

Tiwari K., Gupta RK. (2011). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel Antibiotics. *Crit Rev Biotechnol.*, 32:108–132.

Tiwari K., Gupta RK. (2013). Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Crit Rev Biotechnol.*, 39:256–294.

Toumatia O., Yekkour A., Goudjal Y., Riba A., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Zitouni A. (2014). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *J Basic Microbiol.*, 54:1–8.

Trujillo ME., Goodfellow M. (2012). Genus I. *Actinopolyspora* Gochnauer *et al.* 1975. In Goodfellow *et al.* (Editors). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, vol. V. The Actinobacteria, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer. pp. 163–170.

## V

Vaddavalli R., Peddi S., Kothagauni SY., Begum Z., Gaddam B., Periketi M., Linga VR. (2014). *Saccharopolyspora indica* sp. nov., an actinomycete isolated from the rhizosphere of *Callistemon citrinus* (Curtis). *Int J Syst Evol Microbiol.*, 64:1559–65.

Van de Sande WW. (2013). Global burden of human mycetoma: A systematic review and meta-analysis. *Plos Negl Trop Dis.*, 7:2550.

Ventosa A., Nieto JJ., Oren A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 62:504–544.

Ventosa A., Sanchez-Porro C., Martin S., Mellado E. (2005). Halophilic archaea and bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. In: Gunde-Cimerman A, Oren A, Plemenitas A (Eds) *Adaptation of life at high salt concentrations in archaea, bacteria and eukarya*. Springer, Heidelberg. pp. 337–354.

Veyisoglu A., Sazak A., Cetin D., Guven K., Sahin N. (2013). *Saccharomonospora amisosensis* sp. nov., isolated from deep marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:3782–3786.

Veziris N., Chauffour A., Escolano S., Henquet S., Matsuoka M., Jarlier V., Aubry A. (2013). Resistance of *M. leprae* to Quinolones: A Question of Relativity?. *Plos Negl Trop Dis.*, 7:e2559.

## W, X

Wayne LG., Brenner DJ., Colwell RR., Grimont PAD., Kandler O., Krichevsky MI., Moore LH., Moore WEC., Murry RGE., Stackebrandt E., Starr MP., Trüper HG. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.*, 37:463–464.

Williams PG., Buchanan GO., Feling RH., Kauffman CA., Jensen PR., Fenical W. (2005). New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *J Org Chem.*, 70:6196–6203.

Williams ST., Lanning S., Wellington EMH. (1984). Ecology of Actinomycetes. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Eds: M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. pp. 481–528.

Williams ST., Goodfellow M., Alderson G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriol.*, vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins Co. pp. 2452–2492.

Woese CR., Fox GE. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci.*, 74:5088–5090.

Woese CR. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev.*, 51:221–271.

Wu J., Guan T., Jiang H., Zhi X., Tang S., Dong H., Zhang L. and Li W. (2009). Diversity of actinobacterial community in saline sediments from Yunnan and Xinjiang, China. *Extremophiles*, 13:623–632.

Wu JF., Li J., You ZQ., Zhang S. (2014). *Prauserella coralliicola* sp. nov., isolated from the coral *Galaxea fascicularis*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 64: 3341–3345.

Xie QY., Wang C., Wang R., Qu Z., Lin HP., Goodfellow M., Hong K. (2011). *Jishengella endophytica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 61:1153–1159.

## Y

Yamaguchi T. (1965). Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J Bacteriol.*, 89:444–453.

Yang LL., Tang SK., Zhang YQ., Zhi XY., Wang D., Xu LH., Li WJ. (2008). *Thermobifida halotolerans* sp. nov., isolated from a salt mine sample, and emended description of the genus *Thermobifida*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 58:1821–1825.

Yassin AF., Rainey FA., Brzezinka H., Jahnke KD., Weissbrodt H., Budzikiewicz H., Stackebrandt E., Schaal KP. (1995). *Lentzea* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 45:357–363.

Yekkour A., Sabaou N., Zitouni A., Errakhi R., Mathieu F., Lebrihi A. (2012). Characterization and antagonistic properties of *Streptomyces* strains isolated from Saharan soils, and evaluation of their ability to control seedling blight of barley caused by *Fusarium culmorum*. *Lett Appl Microbiol.*, 55:427–435.

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

Yoshida M., Matsubara K., Kudo T., Horikoshi K. (1991). *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int J Syst Bacteriol.*, 41:15–20.

## Z

Zaitlin B., Watson SB., Ridal J., Satchwill T., Parkinson D. (2003). Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res J Can.*, 95:113–118.

Zaitlin B., Watson SB. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res.*, 40:1741–1753.

- Zazopoulos E., Huang K., Staffa A., Liu W., Bachmann BO., Nonaka K., Ahlert J., Thorson J. S., Shen B., Farnet CM. (2003). A genomics guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat Biotechnol.*, 21:187–190.
- Zenova GM., Manucharova NA., Zvyagintsev DG. (2011). Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Soil Biol.*, 44:417-436.
- Zhang C., Kim SK. (2010). Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Mar Drugs.*, 8:1920–1934.
- Zhang YQ., Liu HY., Chen J., Yuan LJ., Sun W., Zhang LX., Zhang YQ., Yu LY. and Li WJ. (2010). Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai–Tibet plateau, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98:213–223.
- Zhang YJ., Zhang WD., Qin S., Bian GK., Xing K., Li YF., Cao CL., Jiang JH. (2013) *Saccharopolyspora dendranthema* sp. nov. a halotolerant endophytic actinomycete isolated from a coastal salt marsh plant in Jiangsu, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103:1369–76.
- Zhao LX., Huang SX., Tang SK., Jiang CL., Duan Y., Beutler JA., Henrich CJ., McMahon JB., Schmid T., Blees JS., Colburn NH., Rajski SR., Shen B. (2011). Actinopolysporins A-C and tubercidin as a Pdc4 stabilizer from the halophilic actinomycete *Actinopolyspora erythraea* YIM 90600. *J Nat Prod.*, 74:1990–1995.
- Zhi XY., Li WJ., Stackebrandt E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59:589–608.
- Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., Labeda DP. (2004). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., a new species isolated from a Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 54:1377–1381.
- Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2005). *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res Microbiol.*, 156:984–993.
- Zvyagintsev DG., Zenova GM., Oborotov GV. (2009). Moderately haloalkaliphilic actinomycetes in salt-affected soils. *Eurasian Soil Science*, 42:1515–1520.

# **ANNEXES**



## ANNEXE 1

### MILIEUX DE CULTURE

#### I. MILIEUX D'ISOLEMENT DES ACTINOBACTERIES

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

Chitine: 2 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,35 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,15 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,2 g; NaCl: 200 g, CaCO<sub>3</sub>: 0,02 g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 10 mg; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 1 mg; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 1 mg; agar: 18 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml. pH = 7,2.

Pour ce milieu, sont ajoutés:

- Les vitamines: thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine-HCl, inositol, panthoténate de calcium: à raison de 0,5 mg/L et biotine: 0,25 mg/L. Les vitamines sont stérilisées à l'éther puis dissoutes en solution aqueuse stérile avant d'être ajoutées aseptiquement au milieu autoclavé.
- Une solution stérile d'un antifongique, le cycloheximide (actidione) à 50 mg/l.

##### 2. Milieu "complex medium agar" = CMA (Chun *et al.*, 2000)

Peptone: 7,5 g; extrait de levure: 10 g; citrate de sodium: 3 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 10 g; KCl: 2 g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 1 ml d'une solution à 4,98%; NaCl: 200 g; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; pH = 7,2.

#### II. MILIEUX D'IDENTIFICATION DES ACTINOBACTERIES

##### 1. Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966). L'ISP4 est prêt à l'emploi (DIFCO).

### 1.1. Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

### 1.2. Milieu ISP4

Amidon: 10 g;  $K_2HPO_4$ : 1 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 1 g;  $(NH_4)_2SO_4$ : 2 g;  $CaCO_3$ : 2 g; solution saline standard: 1 ml; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml. pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

### 1.3. Milieu CMA ("Complex medium agar" )

Voir composition en haut. La concentration de NaCl ajoutée est de 150 g/l.

### 1.4. Gélose nutritive

Peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; NaCl: 5 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

## 2. Etude physiologique

### 2.1. Dégradation des glucides et dérivés (Gordon *et al.*, 1974)

Les glucides, stérilisés à l'éther, sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1% après autoclavage.

Composition :  $(NH_4)_2 HPO_4$ : 1 g;  $KH_2PO_4$ : 0,5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,2 g; extrait de levure: 1g, solution aqueuse de rouge de phénol (0,04%): 20 ml; eau distillée: q.s.p. 1000 ml. pH = 7,2. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif) et après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

### 2.2. Utilisation des différentes sources d'azote (Gordon *et al.*, 1974)

Le milieu utilisé est le même que celui employé pour la dégradation des glucides, mais sans extrait de levure et  $(NH_4)_2 HPO_4$ .

### **2.3. décarboxylation des acides organiques (Gordon *et al.*, 1974)**

Composition: sel de sodium (citrate, acétate ou autres): 2 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,2 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5 g agar: 15 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04%: 20 ml, pH = 6,8. Pour les halophiles, ajouter 150 g de NaCl.

La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

### **2.4. Dégradation de la xanthine, de l'hypoxanthine, de l'adénine, de la tyrosine et de la guanine (Gordon *et al.*, 1974)**

Composition : 0,4 g de chaque composé (sauf pour la guanine: 0,2 g) est suspendu dans 10 ml d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile et maintenue en surfusion à 50°C.

La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

### **2.5. Dégradation de la caséine du lait (Gordon *et al.*, 1974)**

10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH = 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH = 7,5) contenant 150 g de NaCl et 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

### **2.6. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1973)**

Composition: 4 g de gélatine pour 100 ml de gélose nutritive contenant 150 g de NaCl. Le réactif de Frazier permet de mettre en évidence la dégradation de la gélatine (auréole claire autour des colonies).

### **2.7. Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1973)**

Composition: 10 g d'amidon pour 100 ml de gélose nutritive contenant 150 g de NaCl. Une solution de Lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

### **2.8. Dégradation de l'esculine et de l'arbutine (Marchal *et al.*, 1987)**

Composition: Esculine (ou arbutine): 1g; citrate de fer ammoniacal: 1g; peptone: 10g; agar: 18g; eau distillé q.s.p.: 1000 ml. pH = 7,2

La dégradation des ces deux hétérosides se manifeste par l'apparition d'un pigment brun à noir autour des colonies.

### **2.9. Dégradation du Tween 80** (Sierra, 1957)

Composition: NaNO<sub>3</sub>: 1 g; extrait de levure: 5 g; solution saline: 50 ml; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O: 0,1 g; Tween 80: 10 ml; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; agar: 18 g. pH = 7,2.

- Solution saline: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,25 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,125 g; NaCl: 150 g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,001 g; MnSO<sub>4</sub>: 0,001 g; eau distillée: q.s.p. 50 ml.

La dégradation du Tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

### **2.10. Sensibilité au lysozyme** (Gordon et Barnett, 1977)

Composition :

- Solution A: 10 mg de lysozyme dans 100 ml d'eau distillée. Ultrafiltrer.
- Solution B: peptone: 5 g; extrait de viande: 0,3 g; glycérol: 7 ml; NaCl: 150 g; eau distillée 100 ml; pH: 7. Autoclaver.

Milieu final: mélanger 5 ml de A et 95 ml de B. répartir dans des tubes stériles à raison de 2,5 ml par tube.

La lecture est réalisée par comparaison avec un témoin sans lysozyme.

### **2.11. Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl**

Milieu gélose nutritive contenant 0, 7, 10, 15, 20, 25, 30% de NaCl.

### **2.12. Production de nitrate réductase** (Marchal et Bourdon, 1973)

Composition : peptone: 1g; extrait de viande: 1g; extrait de levure: 2g; KNO<sub>3</sub>: 1g; eau distillé q.s.p. 1000 ml. pH = 7,2

La recherche de la nitrate réductase est effectuée grâce au réactif de Griess.

### **2.13. Sensibilité aux antibiotiques**

Milieu gélose nutritive contenant les antibiotiques suivant: érythromycine (15 mg/l), tétracycline (30 mg/l) et acide nalidixique (30 mg/l).

**ANNEXE 2**  
**REVELATEURS CHIMIQUES UTILISES POUR**  
**LES PHOSPHOLIPIDES (Merck, 1975)**

**1. Anisaldéhyde-acide sulfurique:**

Révéléateur des phospholipides contenant de la glucosamine.

- Solution de vaporisation: solution fraîchement préparée de 0,5 ml d'anisaldéhyde dans 50 ml d'acide acétique cristallisable + 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.
- Traitement complémentaire: chauffer 5 à 10 min à 100-105°C jusqu'à l'apparition des taches (rose-violet-gris).

**2. Bleu de molybdène pour la révélation des phospholipides (Sigma, prêt à l'emploi). (Minnikin *et al.*, 1977)**

- Dissoudre 1,3 g d'oxyde de molybdène dans une solution contenant 23,5 ml d'acide sulfurique concentré et 100 ml d'eau distillée.
- Pulvériser les plaques de CCM avec la solution. Les phospholipides se colorent en bleu.

**3. Molybdate-acide sulfurique pour la révélation des lipides et des glycolipides (Sigma, prêt à l'emploi).**

- Dissoudre 0,25 g de molybdate d'acide phosphorique dans 50 ml d'éthanol.
- Pulvériser les plaques de CCM avec la solution. Chauffer à 120 °C jusqu'à l'apparition des tâches. Les lipides et les glycolipides se colorent en bleu-violacé à bleu-verdâtre ou brun à gris noirâtre.

**4. Ninhydrine**

Révéléateur des phospholipides azotés.

- Solution de vaporisation: dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'éthanol.
- Traitement complémentaire: chauffer à 110°C (5 à 10 min) jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette ou rose).

### **5. Réactif de Dragendorff:**

Il est utilisé pour révéler la phosphatidylcholine.

- Solution a: dissoudre 0,85 g de nitrate de bismuth basique dans 10 ml d'acide acétique cristallisable et 40 ml d'eau.
- Solution b: dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 20 ml d'eau.
- Solution de réserve: mélanger a et b (volumes égaux). Cette solution se conserve bien au réfrigérateur (flacon sombre).
- Solution de vaporisation: avant emploi, mélanger 1 ml de solution de réserve, 2 ml d'acide acétique cristallisable et 10 ml d'eau.

Les taches de phosphatidylcholine apparaissent de couleur jaune-rouge (à froid).

ANNEXE 3

SEQUENCE DES NOUVEAUX TAXONS  
D'ACTINOBACTERIES HALOPHILES

1. *Mzabimyces algeriensis* H195<sup>T</sup>

TCGGGGGGTGGATGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCCGTACT  
TCGGGATAAGCCTCGGAAACGAGGTCTAATACCGGATAGGACATCGTGTCGCATGGCG  
CGGTGTGGAAAGTTGCGGCGGTACGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTGGATGGTGG  
GGTCACGGCCCACCATGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCTGCAGTGAGGAATCTTGCGCA  
ATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGACGGCCTTCGGGTTGTA  
AACCTCTTTCGGCCCCGACGAAGCAGGACGGTAGGGGCAGAAGAAGCGCCGGCTAAC  
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGC  
GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCGGTTCGTGAAAAATCACAGCTCAACTGTG  
AACGTGCGGCCGATACGGGCAGACTCGAGGGCGGTAGAGGCAAGCGGAATTCCTGGT  
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGACGGCGAAGGCAGCTTGCTG  
GGCCGTGCCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT  
GGTAGTCCACGCCGTAAACATTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCGTTTCGGTGTCCGTGC  
CGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA  
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACG  
CGAAGAACCTTACCTGGGTTGGACATGCCCGGATCGCCTCAGAGATGGGGTTTCCCTTC  
GGGGCCGGTGCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGT  
TTAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAATTCGGTTGGGGACTC  
GCGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATG  
CCCCTTATGCCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTGGCCAAGC  
CGTAAGGCGGAGCGAATCCCTGCAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACT  
CGACCCCGTGAAGCCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATAC  
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGC  
CCGCGGCCCAACCCGTTTGCGGGGGGGAG

2. *Prauserella isguenensis* H225<sup>T</sup>

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGT  
ACGCTGAAGCCCGCGCTTGCCTGGGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG  
GTAATCTGCCTTGTACTCTGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGA  
CCATTCTCCGCATGGGGGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTATGAGTTGAGCCCGCGGCC  
TATCAGCTTGTGGTGGGGTGGTGGCCTACCAAGGCGGTGACGGGTAGCCGGCCTGAG  
AGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG  
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACGAAGGGTGATACTGACGGTACC  
TGGAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCA  
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTGTGTGCGGTCTGCCG  
TGGAACCTACAGCTTAACTGTGGGCGTGCGGTGGATACGGGCATCACTTGAGTTCGG  
CAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA

CCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG  
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGT  
GGGGTGTCTGCCACGCACTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGA  
GTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGA  
GCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGCACTGG  
ATCGCCGTAGAGATACGGTTTTCTTCGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGC  
AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGCGT  
TGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCGTGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG  
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAAT  
GGCTGGTACAGAGGGTGGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTC  
AGTTCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAG  
ATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCA  
CGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCCGCGGCCCAACCCCTTTTTTGGGGAGGGA

### 3. *Actinopolyspora biskrensis* H254<sup>T</sup>

CCATGGGTCTCAGGACGGAACGCTGACGGGCGCGCTTCACACATGCAAGTCGAACGCT  
CGCACCCCGTGTGCTCATTCTTTTCGAGGGTGGGTTGGGGTGTGGGAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCGGGCGTGGGGATAACCCTGGGAAACTGGGGCT  
AATACCGGATGTGCTGCATGCCTCGCATGGGGTGTGTGGGAAAGGTTACCTTTGTGA  
GGGGGTGTTCCGGCCTGGGTGGGGCTCGCGGCCCATCAGCTTGTGGTGCGGTGAGGG  
CGTACCAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT  
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTTCGCAATGGGCG  
GAAGCCTGACGCAGCGACGCCGTGTGGGGGAGGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTT  
TCGGCCCTGACGAATGTGACGGTAGGGGCTAAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAG  
CAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCT  
CGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCCGTGCGTGGAAATGCGCAGCTTAACTGGGCACGTGCGGC  
CGATACGGGCAGACTCGAGGGCGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA  
AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCTTGCTGGGCCGTTCCCTG  
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGC  
TGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCGTTGTGGTGTCCGTGCCGTAGCTAACGC  
ATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG  
GGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA  
CCTGGGTTTGACATACACCGGATTGCCTCAGAGATGGGGTTTCCCTTGTGGCTGGTGT  
CAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAAC  
GAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGACTCGCGGGAGACTGC  
CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCA  
GGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTGGCGAGACCGTGAGGTGGAG  
CGAATCCCGGAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCTGTGAAG  
TCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT  
GTACACACCGCCCGTCACGTGATGAAAGTCGGTAACACCCTAAGCTCATGGTCCAACC  
ACACGGTGTGTGGGGGGCGTGGTCGAA





**PUBLICATIONS**

# *Mzabimycetes algeriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinobacterium isolated from a Saharan soil, and proposal of *Mzabimycetaceae* fam. nov.

Rafika Saker · Nouredine Bouras · Abdelghani Zitouni ·  
Mostefa Ghoul · Manfred Rohde · Peter Schumann ·  
Cathrin Spröer · Nasseridine Sabaou · Hans-Peter Klenk

Received: 10 May 2014 / Accepted: 26 August 2014 / Published online: 4 September 2014  
© Springer International Publishing Switzerland 2014

**Abstract** Three halophilic mycelium-forming actinobacteria, strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151, were isolated from a Saharan soil sample collected from Béni-isguen in the Mzab region (Ghardaïa, South of Algeria) and subjected to a polyphasic taxonomic characterisation. These strains were observed to show an aerial mycelium differentiated into coccoid spore chains and fragmented substrate mycelium. Comparative analysis of the 16S rRNA gene sequences revealed that the highest sequence similarities were

to *Saccharopolyspora qijiaojingensis* YIM 91168<sup>T</sup> (92.02 % to H195<sup>T</sup>). Phylogenetic analyses showed that the strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 represent a distinct phylogenetic lineage. The cell-wall hydrolysate was found to contain *meso*-diaminopimelic acid, and the diagnostic whole-cell sugars were identified as arabinose and galactose. The major cellular fatty acids were identified as iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub> and anteiso-C<sub>17:0</sub>. The diagnostic phospholipid detected was phosphatidylcholine and MK-9 (H<sub>4</sub>) was found to be the predominant menaquinone. The genomic DNA G+C content of strain H195<sup>T</sup> was 68.2 mol%. On the basis of its phenotypic features and phylogenetic position, we propose that strain H195<sup>T</sup> represents a novel genus and species, *Mzabimycetes algeriensis* gen. nov., sp. nov., within a new family, *Mzabimycetaceae* fam. nov. The type strain of *M. algeriensis* is strain H195<sup>T</sup> (=DSM 46680<sup>T</sup> = MTCC 12101<sup>T</sup>).

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10482-014-0271-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Saker · N. Bouras · A. Zitouni · N. Sabaou (✉)  
Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens  
(LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger,  
Algeria  
e-mail: sabaou@yahoo.fr

M. Ghoul  
Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Natural  
Science and Life, University of Ferhat Abbas-Sétif, Sétif,  
Algeria

M. Rohde  
HZI – Helmholtz Centre for Infection Research,  
38124 Brunswick, Germany

P. Schumann · C. Spröer · H.-P. Klenk (✉)  
Leibniz Institute DSMZ - German Collection of  
Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7B,  
38124 Brunswick, Germany  
e-mail: hpk@dsmz.de

**Keywords** Halophilic actinobacteria · *Mzabimycetes algeriensis* gen. nov., sp. nov. · *Mzabimycetaceae* · Saharan soil · Polyphasic taxonomy

## Introduction

Halophilic and halotolerant actinobacteria constitute a relatively heterogeneous group, with taxa belonging to different genera and families. Among these families is *Actinopolysporaceae*, which includes only the genus

*Actinopolyspora* with 11 species with valid names (all of them halophilic) (Guan et al. 2013a, b; Meklat et al. 2013a, c). The family *Pseudonocardiaceae* includes several halophilic species belonging to different genera, such as *Amycolatopsis*, *Prauserella*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* and *Yuhushiella* (Hamedi et al. 2013). Four of the five genera in the family *Nocardiopsaceae*, including *Nocardiopsis*, *Streptomonospora*, *Haloactinospira* and *Marinactinospira*, contain a number of halophilic species (Hamedi et al. 2013).

Several halophilic actinobacteria have been isolated from various saline ecosystems, such as soils, lakes and sediments. Recently, several new species have been described (Tang et al. 2009a, b, 2011a, b; Ray et al. 2013). In the Algerian Sahara, many halophilic actinobacterial strains were isolated from various saline and non-saline soil samples (Meklat et al. 2011). Furthermore, several new species belonging to the genera *Actinopolyspora* (*A. algeriensis*, *A. saharensis*, *A. righensis* and *A. mzabensis*) and *Saccharopolyspora* (*S. ghardaiensis*) were reported from these soils (Meklat et al. 2012, 2013a, b, c, 2014).

During our investigation on halophilic actinobacteria from the Sahara desert of Algeria, three novel strains designated H195<sup>T</sup>, H150 and H151, were isolated and their placement in the new family *Mzabimycetaceae* as representatives of a novel species in a new genus is reported here.

## Materials and methods

### Isolation of strains

In this study, three strains, H195<sup>T</sup>, H150 and H151, were isolated from a soil sample (from 0–10 cm depth) collected from Ahbas palm grove in Béni-isguen, Ghardaïa (32°27'N, 3°41'E), an arid area in Mzab region (South of Algeria), after 21 days of incubation at 30 °C on the chitin-vitamin agar medium described by Hayakawa and Nonomura (1987) supplemented with cycloheximide (50 µg ml<sup>-1</sup>) and 15 % (w/v) NaCl. The three strains formed a white aerial mycelium and non-coloured substrate mycelium without diffusible pigment. The strains were isolated, purified and maintained at 4 °C on complex medium

(CM) agar (Chun et al. 2000) containing 15 % (w/v) NaCl. Strain H195<sup>T</sup> has been deposited in the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures as strain DSM 46680<sup>T</sup> and in the Microbial Type Culture Collection (MTCC), India, as strain MTCC 12101<sup>T</sup>. Strains H150 and H151 have been deposited as DSM 45968 and DSM 45969, respectively.

### Morphological and physiological characterization

Cultural characteristics of strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 were investigated after 7, 14 and 21 days of incubation at 30 °C using the media of the International *Streptomyces* Project (ISP 2, ISP 3, ISP 4 and ISP 5) (Shirling and Gottlieb 1966), CM agar (Chun et al. 2000) and nutrient agar (bacteriological peptone, 5 g; meat extract, 1 g; yeast extract, 2 g; NaCl, 150 g; agar, 18 g; deionized water, 1,000 ml; pH 7.2). The degree of growth, the colours of substrate and aerial mycelia, and any soluble pigments produced were determined according to the ISCC-NBS colour charts (Kelly and Judd 1976).

The morphological characteristics of strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151, including spore size, spore-chain morphology and surface ornamentation, were examined using a light microscope (Motic, B1 Series, Hong Kong) and scanning electron microscope (model S450; Hitachi, Japan) after 2 weeks growth on ISP 2 medium, ISP 4 medium, CM agar and nutrient agar at 30 °C. All media used for morphological characteristics were supplemented with 15 % (w/v) NaCl.

Physiological characteristics of strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 were determined as follows. Growth and production of acid from carbohydrates, and decarboxylation of organic acids were studied using the method of Gordon et al. (1974). Degradation of other organic compounds was evaluated as described by Goodfellow (1971). Lysozyme sensitivity and reduction of nitrate were examined according to the methods of Gordon and Barnett (1977) and Marchal et al. (1987), respectively. Growth at different temperatures (20, 30, 45 and 50 °C), pH (5, 7 and 9) and NaCl concentrations (0, 7, 10, 15, 20, 25, 30, and 32 % w/v), and in the presence of antibiotics was determined on nutrient agar medium. All culture media used for physiological tests contained 15 % (w/v) NaCl (except for the NaCl concentration test).

## Chemotaxonomic analysis

For chemotaxonomic analyses, the biomass of the studied strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 was obtained by cultivation using complex medium (CM) broth containing 15 % (w/v) NaCl at 30 °C for 1 week in a rotary shaker (250 rpm). Biomass was harvested by centrifugation at 4,000 rpm and washed twice with deionized water. The composition of whole-cell sugars was determined as described by Lechevalier and Lechevalier (1970). The isomeric form of diaminopimelic acid and the presence (or not) of glycine in the cell wall were determined as described by Becker et al. (1964). Phospholipids and mycolic acids were analyzed using the procedure of Minnikin et al. (1977, 1980). Menaquinones were extracted following the procedure of Minnikin et al. (1984) and were analyzed by HPLC (Kroppenstedt 1982, 1985). Cellular fatty acid composition was determined as described by Sasser (1990) using the Microbial Identification System (MIDI) Sherlock version 6.1 (method TSBA40, TSBA6 database).

## Genetic and phylogenetic analysis

Cultures of strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 were grown on the CM broth supplemented with 15 % (w/v) NaCl and the genomic DNA of each strain was extracted with a DNA extraction kit (MasterPure<sup>TM</sup> Gram Positive DNA Purification Kit, Epicentre<sup>®</sup> Biotechnologies, Madison). PCR amplification of the 16S rRNA gene was performed as described by Rainey et al. (1996). PCR products were purified with a PCR product purification kit (Qiagen, Germany). The primers used for sequencing are listed in Coenye et al. (1999). The sequences obtained were compared with sequences present in the public sequence databases as well as with the EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim et al. 2012). Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 5 (Tamura et al. 2011). The 16S rRNA gene sequences of the strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 were aligned against related nucleotide sequences using the CLUSTAL W (with default parameters) (Thompson et al. 1994). Phylogenetic trees were constructed by using the neighbour-joining (Saitou and Nei 1987), maximum-likelihood (Felsenstein 1981) with Kimura 2-parameter (Kimura 1980) model and maximum-parsimony (Fitch 1977) methods. Bootstrap analysis

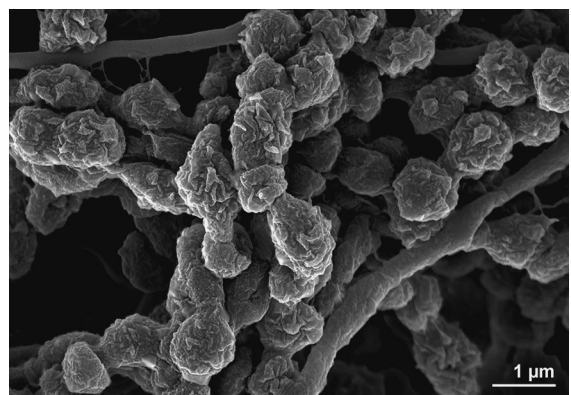
(Felsenstein 1985) was performed to evaluate the reliability of the tree topology.

DNA–DNA hybridizations were carried out between the strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151, as described by De Ley et al. (1970) incorporating the modifications described by Huss et al. (1983). The experiments were done as duplicates in 2× SSC in the presence of 10 % formamide at 71 °C.

The G+C content of the chromosomal DNA was determined for strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151, by HPLC as described by Mesbah et al. (1989).

## Results and discussion

The strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 exhibited good growth on ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5, nutrient agar and CM agar media. Aerial mycelium was observed to be moderately produced with white to greyish white colour on these media. The substrate mycelium was observed to be light yellow colour on ISP 2, nutrient agar and CM agar media and colourless on ISP 3, ISP 4 and ISP 5 media. Melanoid pigments and other diffusible pigments were not released on tested media. The substrate mycelium of strains was found to be well developed and fragmented into non-motile coccoid elements. The fragmentation was observed on both solid and liquid media. The aerial mycelium was observed to be irregularly branched and to form straight to flexuous chains of 3–15 spores per chain. The spores (0.9–1.2 × 1.0–1.2 μm) were found to be non-motile, coccoid and rugose-surfaced (Fig. 1).



**Fig. 1** Scanning electron micrograph of coccoid chains of rugose spores of strain H195<sup>T</sup> grown on ISP 2 medium containing 15 % (w/v) NaCl for 2 weeks at 30 °C. Bar 1 μm

**Table 1** Differential phenotypic characteristics of strains H195<sup>T</sup>, H150, H151 and its closest relative recognized species of the genus *Actinopolyspora* and *Saccharopolyspora*

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Spore surface	Rugose	Rugose	Rugose	Smooth	Smooth	Rugose	Smooth	Smooth	Smooth
Utilization of									
L-Arabinose	–	–	–	–	–	–	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	–	+	ND	ND	ND	+
D-Fructose	+	+	+	–	–	+	+	+	+
Inositol	–	–	–	ND	ND	+	+	–	ND
D-Lactose	+	–	–	+	–	+	ND	ND	+
L-Maltose	+	+	+	+	+	+	ND	–	+
D-Mannitol	+	–	+	+	+	+	+	–	–
D-Mannose	–	–	–	+	+	ND	ND	–	+
L-Raffinose	+	–	–	–	+	+	ND	–	–
L-Rhamnose	–	–	–	+	–	+	+	–	+
Sucrose	+	+	+	–	+	+	ND	–	+
Trehalose	–	–	–	+	+	ND	ND	ND	–
D-Xylose	–	–	–	–	–	+	+	+	+
Decomposition of									
Adenine	+	+	+	–	–	–	ND	ND	+
Casein	–	–	–	–	–	–	+	ND	+
Gelatin	–	–	–	+	+	+	+	+	+
Hypoxanthine	+	+	+	+	–	+	ND	ND	+
Tween 80	+	+	+	–	+	ND	+	+	+
L-Tyrosine	+	+	+	–	–	+	ND	ND	+
Xanthine	+	+	+	+	–	+	–	ND	–
NaCl range (% w/v)	7–30	10–30	7–25	6–22	5–25	0–10	15–30	8–25	10–30
Temperature range (°C)	20–45	20–45	20–45	20–40	25–42	37–63	10–43	25–50	20–40

Data for reference strains were taken from Tang et al. (2009b) (*Saccharopolyspora qijiaojingensis* YIM 91168<sup>T</sup>), Guan et al. (2011) (*Saccharopolyspora lacisalsi* TRM 40133<sup>T</sup>), Kim and Goodfellow (2012) (*Saccharopolyspora rectivirgula* ATCC 33515<sup>T</sup>), Tang et al. (2011b) and Goodfellow and Trujillo (2012) (*Actinopolyspora halophila* ATCC 27976<sup>T</sup>), Guan et al. (2010) (*Actinopolyspora xinjiangensis* TRM 40136<sup>T</sup>) and Meklat et al. (2013a) (*Actinopolyspora righensis* DSM 45501<sup>T</sup>)

+ Positive, – negative, ND not determined

Strains: 1 *Mzabimyces algeriensis* H195<sup>T</sup>; 2 *Mzabimyces algeriensis* H150; 3 *Mzabimyces algeriensis* H151; 4 *Saccharopolyspora qijiaojingensis* YIM 91168<sup>T</sup>; 5 *Saccharopolyspora lacisalsi* TRM 40133<sup>T</sup>; 6 *Saccharopolyspora rectivirgula* ATCC 33515<sup>T</sup>; 7 *Actinopolyspora halophila* ATCC 27976<sup>T</sup>; 8 *Actinopolyspora xinjiangensis* TRM 40136<sup>T</sup>; 9 *Actinopolyspora righensis* DSM 45501<sup>T</sup>

The strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 were found to grow at 20–45 °C, pH 5.0–9.0 and 7–30 % (w/v) of NaCl, but no growth occurred in the absence of NaCl or at 32 % (w/v) NaCl, showing that the three strains are strictly halophilic. The detailed physiological and biochemical characteristics of the type strain H195<sup>T</sup> are given in the species description and in Table 1.

The cell wall hydrolysates of the three strains were found to contain *meso*-diaminopimelic acid (but not glycine) as the diagnostic peptidoglycan diamino acid. The whole-cell hydrolysates were found to contain

arabinose and galactose as the diagnostic sugars (ribose and mannose were also detected). This is typical of cell wall type IV and whole-cell sugar pattern type A (Lechevalier and Lechevalier 1970). Mycolic acids were not detected. The diagnostic phospholipid detected was phosphatidylcholine corresponding to phospholipid type PIII (Lechevalier et al. 1977). Phosphatidylinositol, diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, two unknown glycolipids and one unknown lipid were also detected (Fig. S1). The predominant fatty acids of strains H195<sup>T</sup>, H150

and H151 were identified as iso-C<sub>15:0</sub> (27.3, 29.9 and 33.2 %, respectively), iso-C<sub>16:0</sub> (18.4, 11.3 and 10.5 %, respectively), iso-C<sub>17:0</sub> (15.8, 20.2 and 21.5 %, respectively) and anteiso-C<sub>17:0</sub> (15.7, 16.4 and 14.2 %, respectively). The fatty acids *cis*9 iso-C<sub>17:1</sub> (8.2, 6.9 and 7.3 %, respectively) and anteiso-C<sub>15:0</sub> (4.4, 4.3 and 3.9 %, respectively) were also detected. This fatty acid pattern belongs to fatty acid type 2e as defined by Kroppenstedt and Evtushenko (2006). The major menaquinone detected in strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 was MK-9 (H<sub>4</sub>) at 72, 79 and 79 %, respectively. Other menaquinones were also detected in the three strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151, as follows: MK-9 (H<sub>6</sub>): 9, 4 and 4 %, respectively; MK-9 (H<sub>0</sub>): 8, 5 and 4 %, respectively; MK-9 (H<sub>8</sub>): 2, 1 and 1 %, respectively; MK-9 (H<sub>2</sub>): 2, 2 and 1 %, respectively; and MK-10 (H<sub>4</sub>): 1 % for the three strains.

The G+C content of the genomic DNA was determined to be 68.2 mol% (for H195<sup>T</sup> and H150) and 68.3 mol% (for H151). Almost complete 16S rRNA gene sequences (1,357, 1,369 and 1,403 bp) were determined for strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 (GenBank accession numbers KJ574202, KJ574200 and KJ574201, respectively). Analyses of these sequences indicated that the three strains formed a single cluster in the phylogenetic trees obtained by the neighbour-joining method (Fig. 2), maximum-parsimony (Fig. S2), and maximum-likelihood (Fig. S3) and the two reference strains, H151 and H150 shared at least 98.8 % 16S rRNA gene sequence similarity with the type strain H195<sup>T</sup>. BLAST results for comparison between the 16S rRNA gene sequences of the three strains and the closely related representatives of the families *Pseudonocardiaceae* and *Actinopolysporaceae* indicated very low percentages of similarity to sequences from the members of these two families. These percentages are 91.78–92.18 % with *Saccharopolyspora qijiaojingensis* YIM 91168<sup>T</sup>, 91.73–92.21 % with *Saccharopolyspora lacisalsi* TRM 40133<sup>T</sup> and 92.13–92.42 % with *Saccharopolyspora rectivirgula* ATCC 33515<sup>T</sup> (from the family *Pseudonocardiaceae*); and 91.00–91.34 % with *Actinopolyspora halophila* ATCC 27976<sup>T</sup>, 90.70–91.41 % with *Actinopolyspora xinjiangensis* TRM 40136<sup>T</sup> and 90.61–91.70 % with *Actinopolyspora righensis* DSM 45501<sup>T</sup> (from the family *Actinopolysporaceae*). Compared with members of the families *Pseudonocardiaceae* and *Actinopolysporaceae*, the three halophilic

strains formed a distinct monophyletic clade that was supported by a high bootstrap value (100 %), in particular in relation to the family *Actinopolysporaceae*.

For further verification of the taxonomic positions of strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151, DNA–DNA hybridizations were performed between these strains. The obtained results showed DDH values of 73.9 % between H195<sup>T</sup> and H150 and 97.2 % between H195<sup>T</sup> and H151. These results indicated clearly that the three strains have levels of DNA–DNA relatedness above the 70 % cut-off point recommended by Wayne et al. (1987) for the recognition of genomic species, and so should be considered to belong to the same species, also consistent with their high levels of 16S rRNA gene sequence similarity.

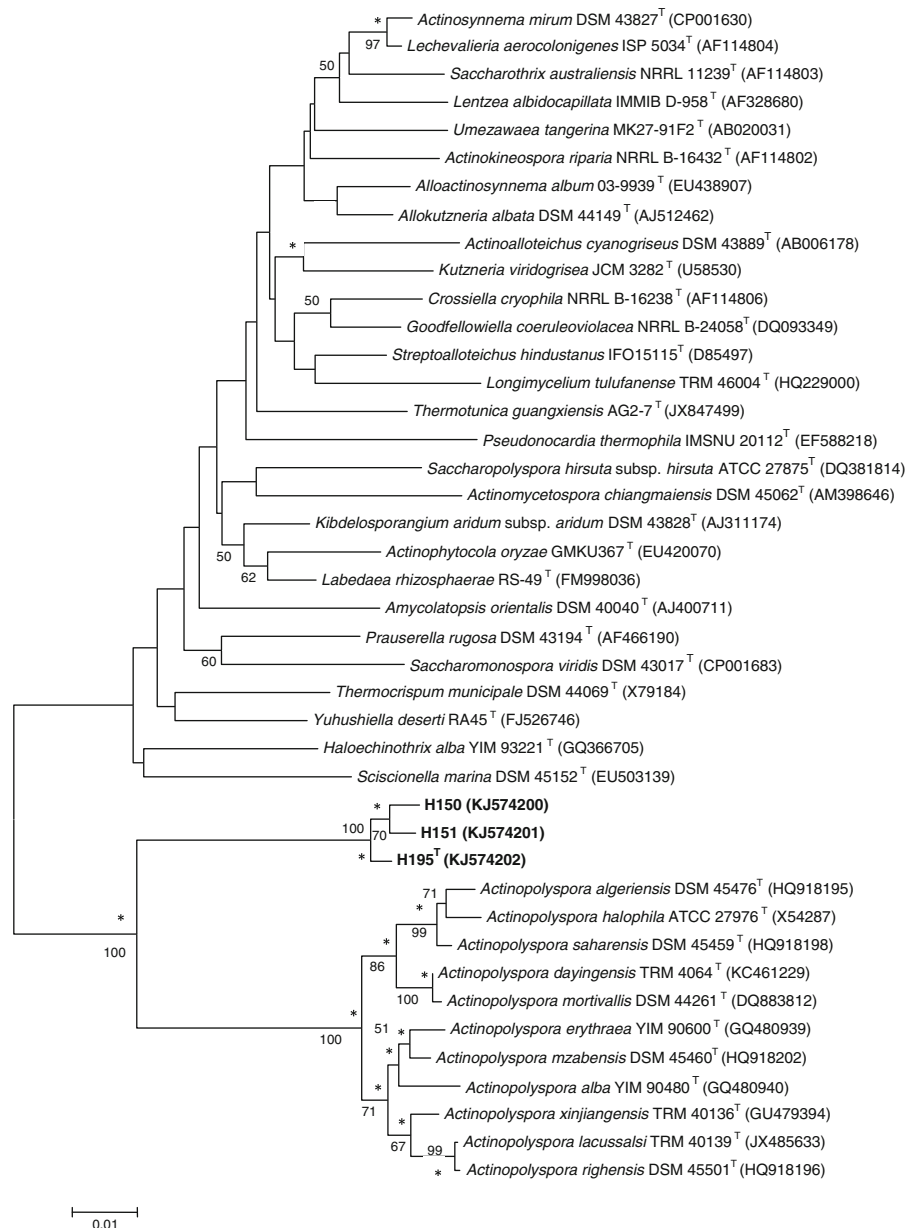
Based on these phenotypic, chemotaxonomic and phylogenetic data, the three strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 are considered to represent a new species belonging to a new genus, for which we propose the name *Mzabimyces* gen. nov. The type species of the genus is *Mzabimyces algeriensis* sp. nov., with strain H195<sup>T</sup> as the type strain.

A unique set of 16S rRNA gene signature nucleotides distinguishes the strains H195<sup>T</sup>, H150 and H151 from members of the closest related families *Pseudonocardiaceae* and *Actinopolysporaceae* (Table 2). Following the guidelines for the affiliation of taxa to higher hierarchical ranks in the class *Actinobacteria* proposed by Stackebrandt et al. (1997) and Zhi et al. (2009), which base the clustering solely on phylogenetic relationships, we propose the description of *Mzabimycetaceae* fam. nov. to accommodate the proposed genus *Mzabimyces*.

### Description of *Mzabimycetaceae* fam. nov

*Mzabimycetaceae* (M.za.bi.my.ce.tace'ae. N.L. masc. n. *Mzabimyces* type genus of the family; -aceae ending to denote a family; N.L. fem. pl. n. *Mzabimycetaceae* the *Mzabimyces* family).

The morphological and chemotaxonomic descriptions are the same as for the genus *Mzabimyces*. The family contains the type genus *Mzabimyces*. The pattern of 16S rRNA gene signature nucleotides is shown in Table 2. The phylogenetic analysis is presented in this study (Fig. 2).



**Fig. 2** Phylogenetic tree calculated from almost complete 16S rRNA gene sequences using Kimura 2 parameter (Kimura 1980) evolutionary distance methods and the neighbour-joining method of Saitou and Nei (1987). This illustrates the taxonomic position of strains H195<sup>T</sup> (1,357 bp), H150 (1,369 bp), H151 (1,403 bp) and members of the family *Pseudonocardiaceae* and

*Actinopolysporaceae*. Asterisks indicate branches of the tree that were also found using the maximum-likelihood (Felsenstein 1981) and maximum-parsimony (Fitch 1971) tree-making algorithms. Numbers on branch nodes are bootstrap values (1,000 resamplings; only values over 50 % are given). Bar 0.01 nucleotide substitution per site

### Description of *Mzabimyces* gen. nov

*Mzabimyces* (M.za.bi.my'ces. N.L. n. *Mzab*, an arid region named Mzab in the South of Algeria, from where the microorganism was isolated; Gr. masc. n.

*mukês* fungus; N.L. masc. n. *Mzabimyces* a fungus of Mzab region).

Gram-positive, aerobic, strictly halophilic, filamentous Actinobacteria. Forms branched and fragmented substrate mycelia and white to greyish white aerial

**Table 2** Patterns of 16S rRNA gene signature nucleotides detected in the family *Mzabimycetaceae* and the closely related families *Pseudonocardiaceae* and *Actinopolysporaceae*

Position	<i>Mzabimycetaceae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i> *	<i>Actinopolysporaceae</i> **
127:234	G–A	G–C	A–U
242:284	G–G	G–A	C–G
480	G	U	U
564	C	U	C
657:749	G–C	U–A	G–C
672:734	C–G	U–G	C–G
828	A	A	A
829:857	G–C	G–C	G–C
831:855	U–G	U–G	U–G
832:854	G–U	G–U	G–U
833:853	U–G	U–G	U–G
840:846	C–G	C–A	C–G
952:1229	U–A	U–A	U–A
986:1219	U–G	U–A	U–A
1100	A	A	U
1117:1183	C–G	U–U	G–C
1309:1328	G–G	G–C	G–U

Nucleotides that clearly differentiate the family *Mzabimycetaceae* and the closely related families *Pseudonocardiaceae* and *Actinopolysporaceae* are shown in bold

\* Data from Zhi et al. (2009), Mao et al. (2011) and Labeda and Goodfellow (2012)

\*\* Data from Zhi et al. (2009) and Goodfellow and Trujillo (2012)

mycelia that differentiate into chains composed of coccoid spores with a rugose surface. No melanoid or any other diffusible pigments are produced. The cell-wall hydrolysate contains *meso*-diaminopimelic acid, and arabinose and galactose as the diagnostic whole-cell sugars. The predominant menaquinone is MK-9 (H<sub>4</sub>) and the diagnostic phospholipid is phosphatidylcholine. The major cellular fatty acids are iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub> and anteiso-C<sub>17:0</sub>. Mycolic acids are not present. The G+C content of the genomic DNA of the type strain of the type species is 68.2 mol%. The type species is *Mzabimyces algeriensis*.

### Description of *Mzabimyces algeriensis* sp. nov

*Mzabimyces algeriensis* (al.ge.ri.en'sis. N.L. masc. adj. *algeriensis*, pertaining to Algeria, the source of the soil from which the type strain was isolated).

Morphological, chemotaxonomic and general characteristics are as given above in the genus description. Aerobic, Gram-stain positive, strictly halophilic filamentous Actinobacteria.

Aerial mycelium is white to greyish white on ISP 2, ISP 4, nutrient agar and CM agar media, and is irregularly branched, and forms straight to flexuous chains of 3–15 coccoid rugose spores (0.9–1.2 × 1.0–1.2 μm) per chain. The colour of the substrate mycelium is light yellow on all culture media tested to date, except ISP 4 (not coloured). The substrate mycelium is well developed and fragments into non-motile coccoid elements. Melanoid and other diffusible pigments are not produced. Growth occurs at 20, 30 and 45 °C, with 30 °C the optimal temperature of these. Growth occurs at pH 5, 7 and 9, with pH 7 the optimal pH of these. Adenine, xanthine, hypoxanthine, L-tyrosine and Tween 80 are degraded; however, casein, starch, guanine, esculin, gelatin, arbutin and testosterone are not decomposed. Utilizes acetate, pyruvate, adonitol, butyrate, maltose, mannitol, sucrose, D-cellobiose, D-fructose, D-glucose, glycerol, D-lactose, D-raffinose and D-sorbitol, as carbon sources, but not citrate, *meso*-inositol, salicin, erythritol, D-melibiose, D-trehalose, D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-mannose, D-melezitose, L-arabinose, L-rhamnose benzoate, propionate, succinate and



L-tartrate. L-proline is used as a source of nitrogen, but not L-serine and L-alanine. Nitrate reductase is not produced. Growth occurs on nutrient agar medium in the presence of NaCl (w/v) at 7, 10, 15, 20, 25 and 30 %, but no growth occurs in the absence of NaCl or at 32 % (w/v) NaCl. The optimal range for growth is 10–20 % NaCl. Growth occurs in the presence of erythromycin (15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and nalidixic acid (30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) but not in the presence of tetracycline (30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and 0.005 % lysozyme. The G+C content of the genomic DNA of the type strain is 68.2 mol%.

The type strain is H195<sup>T</sup> (=DSM 46680<sup>T</sup> = MTCC 12101<sup>T</sup>) isolated from a Saharan soil sample collected from Mزاب region (Algerian Sahara). The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain H195<sup>T</sup> is KJ574202. Strains H150 and H151 have been deposited respectively as DSM 45968 and DSM 45969.

**Acknowledgments** We would like to gratefully acknowledge the technical assistance of Gabriele Pötter and Bettina Sträubler (both at DSMZ).

## References

- Becker B, Lechevalier MP, Gordon RE, Lechevalier HA (1964) Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *J Appl Microbiol* 12:421–423
- Chun J, Bae KS, Moon EY, Jung SO, Lee HK, Kim SJ (2000) *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1909–1913
- Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, Hoste B, Govan JR, Kersters K, Vandamme P (1999) Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:405–413
- De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* 12:133–142
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 20:406–416
- Fitch WM (1977) On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am Nat* 111:223–257
- Goodfellow M (1971) Numerical taxonomy of some nocardiform bacteria. *J Gen Microbiol* 69:33–90
- Goodfellow M, Trujillo ME (2012) Family I. *Actinopolysporaceae*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp 163–170
- Gordon RE, Barnett DA (1977) Resistance to rifampicin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomic tool. *Int J Syst Bacteriol* 27:176–178
- Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Pang CHN (1974) *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol* 24:54–63
- Guan TW, Liu Y, Zhao K, Xia ZF, Zhang XP, Zhang LL (2010) *Actinopolyspora xinjiangensis* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 98:447–453
- Guan TW, Wu N, Xia ZF, Ruan JS, Zhang XP, Huang Y, Zhang LL (2011) *Saccharopolyspora lacisalsi* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Extremophiles* 15:373–378
- Guan TW, Wei B, Zhang Y, Xia ZF, Che ZM, Chen XG, Zhang LL (2013a) *Actinopolyspora lacussalsi* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3009–3013
- Guan TW, Zhao HP, Che ZM, Zhang XP, Zhang LL (2013b) *Actinopolyspora dayingensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a hypersaline lake. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:787–792
- Hamedi J, Mohammadipanah F, Ventosa A (2013) Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 17:1–13
- Hayakawa M, Nonomura H (1987) Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 65:501–509
- Huss VAR, Festl H, Schleifer KH (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* 4:184–192
- Kelly KL, Judd DB (1976) *Color. Universal language and dictionary of names* (National Bureau of Standards special publication 440). US Department of Commerce, Washington
- Kim SB, Goodfellow M (2012) Genus XIV. *Saccharopolyspora*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp 1396–1414
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:716–721
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120
- Kroppenstedt RM (1982) Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase (RP18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases. *J Liq Chromatogr* 5:2359–2367
- Kroppenstedt RM (1985) Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Goodfellow M,

- Minnikin DE (eds) Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, London, pp 173–179
- Kroppenstedt RM, Evtushenko LI (2006) The Prokaryotes, a handbook on biology of bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) The family *Nocardiopsaceae*. Springer, New York, pp 754–795
- Labeda DP, Goodfellow M (2012) Family I. *Pseudonocardia* *ceae*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp 1302–1445
- Lechevalier MP, Lechevalier HA (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* 34:435–444
- Lechevalier MP, de Bièvre C, Lechevalier HA (1977) Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem Syst Ecol* 5:249–260
- Mao J, Wang J, Dai H-Q, Zhang Z-D, Tang Q-Y, Ren B, Yang N, Goodfellow M, Zhang L-X, Liu Z-H (2011) *Yuhushiella deserti* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder *Pseudonocardineae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:621–630
- Marchal N, Bourdon JL, Richard CL (1987) Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin Press, Paris
- Meklat A, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N (2011) Halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria: isolation, taxonomy and antagonistic properties. *Appl Environ Microbiol* 77:6710–6714
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2012) *Actinopolyspora algeriensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil. *Extremophiles* 16:771–776
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013a) *Actinopolyspora righensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil in Algeria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:301–307
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013b) *Actinopolyspora saharensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil of Algeria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103:771–776
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013c) *Actinopolyspora mزابensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from an Algerian Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3787–3792
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Sabaou N, Mathieu F, Schumann P, Spröer C, Klenk HP (2014) *Saccharopolyspora ghardaiensis* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *J Antibiotics* 67:299–303
- Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39:159–167
- Minnikin DE, Patel PV, Alshamaony L, Goodfellow M (1977) Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 27:104–117
- Minnikin DE, Hutchinson IG, Caldicott AB, Goodfellow M (1980) Thin-layer chromatography of methanolsates of mycolic acid-containing bacteria. *J Chromatogr A* 188:221–233
- Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M, Schaal A, Parlett JH (1984) An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 2:233–241
- Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E (1996) The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46:1088–1092
- Ray L, Suar M, Pattnaik AK, Raina V (2013) *Streptomyces chilikensis* sp. nov., a halophilic streptomycete isolated from brackish water sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2757–2764
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sasser M (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101. Microbial ID, Newark
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16:313–340
- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:479–491
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Tang SK, Zhi XY, Wang Y, Wu JY, Lee JC, Kim CJ, Lou K, Xu LH, Li WJ (2009a) *Haloactinobacterium album* gen. nov., sp. nov., a halophilic actinobacterium, and proposal of *Ruaniaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2113–2119
- Tang SK, Wang Y, Wu JY, Cao LL, Lou K, Xu LH, Jiang CL, Li WJ (2009b) *Saccharopolyspora qijiaojingensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2166–2170
- Tang SK, Zhi XY, Wang Y, Shi R, Lou K, Xu LH, Li WJ (2011a) *Haloactinopolyspora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete isolated from a salt lake, with proposal of *Jiangellaceae* fam. nov. and *Jiangellineae* subord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:194–200
- Tang SK, Wang Y, Klenk HP, Shi R, Lou K, Zhang YJ, Chen C, Ruan JS, Li WJ (2011b) *Actinopolyspora alba* sp. nov. and *Actinopolyspora erythraea* sp. nov., isolated from a salt field, and reclassification of *Actinopolyspora iraqiensis* Ruan et al. 1994 as a heterotypic synonym of *Saccharomonospora halophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1693–1698
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680

- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG (1987) International committee on systematic bacteriology. Report of the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int J Syst Bacteriol* 37:463–464
- Zhi XY, Li WJ, Stackebrandt E (2009) An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:589–608

## *Prauserella isguenensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from desert soil

Rafika Saker,<sup>1</sup> Noureddine Bouras,<sup>1,2</sup> Atika Meklat,<sup>1,3</sup> Abdelghani Zitouni,<sup>1</sup> Peter Schumann,<sup>4</sup> Cathrin Spröer,<sup>4</sup> Nasserline Sabaou<sup>1</sup> and Hans-Peter Klenk<sup>4</sup>

### Correspondence

Hans-Peter Klenk  
hpk@dsmz.de  
Nasserline Sabaou  
sabaou@yahoo.fr

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure, Kouba, Alger, Algeria

<sup>2</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algeria

<sup>3</sup>Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie, Université Saâd Dahleb, Blida, Algeria

<sup>4</sup>DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Germany

Two actinomycete strains, designated H225<sup>T</sup> and H137, were isolated from two soil samples collected from the arid region of Ahbas at Béni-Isguen (Mzab), located in the Algerian Sahara. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequences indicated that the novel strains should be assigned to the genus *Prauserella* of the family *Pseudonocardiaceae*, and they were therefore subjected to a polyphasic taxonomic study. These two strains contained meso-diaminopimelic acid as the diagnostic diamino acid and arabinose and galactose as major whole-cell sugars. The diagnostic phospholipid was phosphatidylethanolamine. The predominant menaquinone was MK-9(H<sub>4</sub>), and the major fatty acid was iso-C<sub>16:0</sub>. DNA–DNA hybridization values between strain H225<sup>T</sup> and its closest phylogenetic neighbours, namely *Prauserella flava* DSM 45265<sup>T</sup>, *Prauserella alba* DSM 44590<sup>T</sup>, *Prauserella aidingensis* DSM 45266<sup>T</sup>, *Prauserella salsuginis* DSM 45264<sup>T</sup> and *Prauserella sediminis* DSM 45267<sup>T</sup>, were clearly below the 70% threshold used for species delineation. The genomic DNA G+C content of strains H225<sup>T</sup> and H137 was 70.4 mol%. On the basis of phenotypic and genotypic data, strains H225<sup>T</sup> and H137 are considered to represent a novel species of the genus *Prauserella*, for which the name *Prauserella isguenensis* sp. nov. is proposed. The type strain is H225<sup>T</sup> (=DSM 46664<sup>T</sup>=CECT 8577<sup>T</sup>).

The genus *Prauserella*, a member of the family *Pseudonocardiaceae*, was first described by Kim & Goodfellow (1999) with the transfer of a species previously included in the genera *Nocardia* (Di Marco & Spalla, 1957) and *Amycolatopsis* (Lechevalier *et al.*, 1986). Members of the genus *Prauserella* are characterized by the presence of meso-diaminopimelic acid, arabinose and galactose in whole-cell hydrolysates (wall chemotype IV *sensu*; Lechevalier & Lechevalier, 1970), the predominance of menaquinone MK-9(H<sub>4</sub>) and the absence of mycolic acids. Members of the genus *Prauserella* are aerobic, non-acid-fast, halophilic or halotolerant actinobacteria that form branched substrate

mycelium that undergoes fragmentation into irregular rod-shaped elements. If present, the aerial mycelium forms spores in chains. At the time of writing, the genus comprised 11 recognized species, namely *Prauserella rugosa* (Kim & Goodfellow, 1999), *P. halophila* and *P. alba* (Li *et al.*, 2003), *P. salsuginis*, *P. flava*, *P. aidingensis* and *P. sediminis* (Li *et al.*, 2009), *P. marina* (Wang *et al.*, 2010), *P. muralis* (Schäfer *et al.*, 2010), *P. shujinwangii* (Liu *et al.*, 2014) and *P. coralliicola* (Wu *et al.*, 2014). The present polyphasic study was designed to determine the taxonomic position of two *Prauserella*-like strains. The resultant data show that the strains represent a novel species of the genus *Prauserella*.

During our investigation of halophilic actinobacteria from the arid region of Ahbas (32° 27' N 3° 41' E) at Béni-Isguen (Ghardaïa), an arid area in the Mzab region, located in the Algerian Sahara, two novel strains designated H225<sup>T</sup>

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of strains H225<sup>T</sup> and H137 are KJ504173 and KJ574161, respectively.

Two supplementary figures are available with the online Supplementary Material.

and H137 were isolated by the serial dilution method using chitin-vitamin agar medium (Hsu & Lockwood, 1975) supplemented with 15 % (w/v) NaCl and cycloheximide (50 mg l<sup>-1</sup>). The strains were purified and maintained at 4 °C on complex medium agar described by Chun *et al.* (2000) [Casamino acids, 7 g; yeast extract, 10 g; sodium citrate, 3 g; magnesium sulfate, 10 g; potassium chloride, 2 g; iron sulfate, 1 ml of a solution of 4.98 % (w/v); agar, 20 g; distilled water, 1 litre; pH 7.2] supplemented with 15 % (w/v) NaCl.

Morphological features were observed by light microscopy (B1 series; Motic) on International *Streptomyces* Project (ISP) media (Shirling & Gottlieb, 1966), nutrient agar and complex medium agar (Chun *et al.*, 2000), prepared with 15 % (w/v) NaCl, and following incubation for 2 weeks at 30 °C. The colour of the substrate and aerial mycelia and any diffusible pigments produced were determined by comparison with ISCC-NBS colour charts (Kelly, 1964).

Several physiological tests were used to characterize the actinobacterial strains. Growth with and production of acid from carbohydrates, and decarboxylation of organic acids were studied using the method of Gordon *et al.* (1974). Degradation of other organic compounds was evaluated as described by Goodfellow (1971). Lysozyme sensitivity and reduction of nitrate were examined according to the methods of Gordon & Barnett (1977) and Marchal *et al.* (1987), respectively. Growth in the presence of erythromycin (15 µg ml<sup>-1</sup>), tetracycline (30 µg ml<sup>-1</sup>) and nalidixic acid (30 µg ml<sup>-1</sup>), at different temperatures (10, 20, 30, 37, 45 and 50 °C) and at different pH values (4, 5, 7, 9 and 10) was determined on nutrient agar. All media used for physiological tests contained 15 % (w/v) NaCl (except for the NaCl concentration test).

Biomass for chemotaxonomic analysis was grown in complex medium broth containing 15 % (w/v) NaCl, on a rotary shaker (250 r.p.m.) at 30 °C for 1 week, harvested by centrifugation and washed twice with distilled water. Amino acid and sugar analysis of whole-cell hydrolysates was performed according to the procedures described by Becker *et al.* (1964) and Lechevalier & Lechevalier (1970). Phospholipids and mycolic acids were analysed using the procedure of Minnikin *et al.* (1977, 1980). Menaquinones were extracted following the procedure of Minnikin *et al.* (1984) and separated by HPLC (Kroppenstedt, 1982). Cellular fatty acids were analysed as described by Sasser (1990) using the Microbial Identification System (MIDI) Sherlock version 6.1 (TSBA40 database).

Genomic DNA was extracted with a DNA extraction kit (MasterPure Gram Positive DNA Purification kit; Epicentre Biotechnologies). PCR-mediated amplification of the 16S rRNA gene was performed as described by Rainey *et al.* (1996). The sequences obtained were compared with sequences in public databases as well as in the EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012). Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011). The 16S rRNA gene sequences of

strains H225<sup>T</sup> and H137 were aligned against neighbouring nucleotide sequences using CLUSTAL W (with default parameters) (Thompson *et al.*, 1994). Phylogenetic trees were reconstructed by using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) with the model of Jukes & Cantor (1969), the maximum-likelihood method (Felsenstein, 1981) with Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980) and the maximum-parsimony method (Fitch, 1977). The topology of the phylogenetic tree was evaluated by using the bootstrap resampling method of Felsenstein (1985) with 1000 replicates.

The G+C content of the chromosomal DNA of strains H225<sup>T</sup> and H137 was determined by HPLC as described by Mesbah *et al.* (1989).

DNA-DNA hybridization was carried out as described by De Ley *et al.* (1970) under consideration of the modifications described by Huss *et al.* (1983), using a model Cary 100 Bio UV/VIS spectrophotometer equipped with a Peltier-thermostatted 6×6 multicell changer and a temperature controller with *in-situ* temperature probe (Varian). DNA-DNA hybridization experiments were performed in duplicate in 2 × SSC in the presence of 10 % formamide at 71 °C.

Strains H225<sup>T</sup> and H137 exhibited very good growth on ISP 2, complex medium agar and nutrient agar media, and moderate growth on ISP 4, with well-developed whitish aerial mycelium on all these media except on complex medium agar. The colour of substrate mycelium was light brownish yellow on ISP 2, very pale yellow on nutrient agar, beige on complex medium agar and white on ISP 4. The substrate mycelium fragmented into irregular rod-shaped elements. The aerial mycelium formed short to long spore chains at maturity, which were straight to flexuous, and spores were non-motile. Diffusible pigments and melanoid pigments were not produced. No sporangia, sclerotia or synnemata were observed.

Strains H225<sup>T</sup> and H137 differed physiologically from their closest neighbours in the genus *Prauserella*, as can be seen from the differential characters given in Table 1. They differed from *P. flava* DSM 45265<sup>T</sup>, the phylogenetically closest relative (see below), by the presence of aerial mycelium, spore production and eight physiological tests (NaCl range, L-arabinose, D-galactose, *myo*-inositol, maltose, D-mannitol, raffinose, rhamnose and starch). Strains H225<sup>T</sup> and H137 differed from *P. alba* DSM 44590<sup>T</sup> based on six physiological tests (NaCl range, cellobiose, *myo*-inositol, raffinose, L-serine and starch), from *P. aidingensis* DSM 45266<sup>T</sup> based on seven tests (NaCl range, L-arabinose, maltose, D-mannitol, raffinose, trehalose and starch), from *P. salsuginis* DSM 45264<sup>T</sup> based on eight tests (NaCl range, cellobiose, *myo*-inositol, maltose, D-mannose, raffinose, trehalose and starch) and from *P. sediminis* DSM 45267<sup>T</sup> based on ten tests (NaCl range, L-arabinose, D-fructose, D-galactose, maltose, D-mannitol, raffinose, D-ribose, D-xylose and starch). More complete physiological characteristics of strain H225<sup>T</sup> are given in the species description.

**Table 1.** Phenotypic characteristics that differentiate strains H225<sup>T</sup> and H137 from their closest recognized species of the genus *Prauserella*

Strains: 1, H225<sup>T</sup>; 2, H137; 3, *P. flava* DSM 45265<sup>T</sup>; 4, *P. alba* DSM 44590<sup>T</sup>; 5, *P. aidingensis* DSM 45266<sup>T</sup>; 6, *P. salsuginis* DSM 45264<sup>T</sup>; 7, *P. sediminis* DSM 45267<sup>T</sup>. +, Positive; -, negative. All data are from this study.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Aerial mycelium	+	+	-	+	+	+	+
Spore formation	+	+	-	+	+	+	+
NaCl range (% w/v)	5-25	5-25	5-15	0-25	5-15	5-15	5-20
Optimum NaCl concentration (% w/v)	7-15	7-15	7-10	10-15	7-10	7-10	7-10
Growth with and production of acid from:							
L-Arabinose	+	+	-	+	-	+	-
Cellobiose	-	-	-	+	-	+	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	-
D-Galactose	+	+	-	+	+	+	-
myo-Inositol	-	-	+	+	-	+	-
Maltose	+	+	-	+	-	-	-
D-Mannitol	+	+	-	+	-	+	-
D-Mannose	-	-	-	-	-	+	-
Raffinose	+	+	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	-	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	-
Trehalose	-	-	-	-	+	+	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	-
L-Serine	-	-	-	+	-	-	-
Degradation of starch	+	+	-	-	-	-	-

Strains H225<sup>T</sup> and H137 contained *meso*-diaminopimelic acid as the diagnostic peptidoglycan diamino acid, but not glycine. Whole-cell hydrolysates contained arabinose, galactose, ribose and glucose (H225<sup>T</sup>) or mannose (H137) (wall chemotype IV *sensu*; Lechevalier & Lechevalier, 1970), typical of members of the genus *Prauserella*. The phospholipids comprised phosphatidylethanolamine, phosphatidylhydroxyethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, phosphatidylhydroxymethylethanolamine, diphosphatidylglycerol and phosphatidylinositol, with trace amounts of phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol mannosides as well as two unknown glycolipids (Fig. S1, available in the online Supplementary Material). Mycolic acids were absent. The predominant menaquinone of strains H225<sup>T</sup> and H137 was MK-9(H<sub>4</sub>), which is different from *P. rugosa* DSM 43194<sup>T</sup> which has MK-9(H<sub>2</sub>) and MK-9(H<sub>4</sub>) as the predominant menaquinones, but the same as *P. flava* DSM 45265<sup>T</sup>, *P. alba* DSM 44590<sup>T</sup>, *P. aidingensis* DSM 45266<sup>T</sup>, *P. salsuginis* DSM 45264<sup>T</sup>, *P. sediminis* DSM 45267<sup>T</sup>, *P. halophila* DSM 44617<sup>T</sup>, *P. marina* DSM 45268<sup>T</sup>, *P. coralliicola* DSM 45821<sup>T</sup> and *P. muralis* DSM 45305<sup>T</sup>. Minor amounts of unknown menaquinones (<6%) were also detected. The predominant fatty acid was iso-C<sub>16:0</sub> (38.4% for strain H225<sup>T</sup> and 33.0% for strain H137). The fatty acid profiles of strains H225<sup>T</sup> and H137 were similar to those of the type strains of the closely related species *P. flava*, *P. alba*, *P. aidingensis*, *P. salsuginis* and *P. sediminis*, although some quantitative and qualitative differences were noted (Table 2).

The phylogenetic relationships between strains H225<sup>T</sup> and H137 and members of the genus *Prauserella* are shown in the neighbour-joining (Fig. 1), maximum-parsimony and maximum-likelihood dendrograms (Fig. S2). Strains H225<sup>T</sup> and H137 formed a distinct cluster with members of the genus *Prauserella*. High levels of 16S rRNA gene sequence similarity were found between strain H225<sup>T</sup> and its nearest neighbours, *P. flava* DSM 45265<sup>T</sup> (98.9%), *P. alba* DSM 44590<sup>T</sup> (98.8%), *P. aidingensis* DSM 45266<sup>T</sup> (98.6%), *P. salsuginis* DSM 45264<sup>T</sup> (98.5%) and *P. sediminis* DSM 45267<sup>T</sup> (98.4%).

DNA of strain H225<sup>T</sup> was hybridized with that of its closest phylogenetic neighbours. Strain H225<sup>T</sup> exhibited DNA-DNA relatedness values of 94.1% with strain H137, indicating that they belonged to the same species. Mean DNA-DNA relatedness values between strain H225<sup>T</sup> and *P. flava* DSM 45265<sup>T</sup>, *P. alba* DSM 44590<sup>T</sup>, *P. aidingensis* DSM 45266<sup>T</sup>, *P. salsuginis* DSM 45264<sup>T</sup> and *P. sediminis* DSM 45267<sup>T</sup> were 43.6% (40.7 and 46.5%), 65.5% (68.4 and 62.6%), 40.6% (37.6 and 43.6%), 27.9% (32.8 and 23.0%) and 45.0% (49.0 and 41.0%), respectively, which are clearly below the 70% threshold proposed by Wayne *et al.* (1987) for the delineation of separate species.

The G+C content of the genomic DNA of strains H225<sup>T</sup> and H137 was 70.4 mol%.

The phenotypic, chemotaxonomic and molecular data presented here show that the two novel strains can be

**Table 2.** Cellular fatty acid composition of strains H225<sup>T</sup> and H137 and their most closely related neighbours in the genus *Prauserella*

Strains: 1, H225<sup>T</sup>; 2, H137; 3, *P. flava* DSM 45265<sup>T</sup>; 4, *P. alba* DSM 44590<sup>T</sup>; 5, *P. aidingensis* DSM 45266<sup>T</sup>; 6, *P. salsuginis* DSM 45264<sup>T</sup>; 7, *P. sediminis* DSM 45267<sup>T</sup>. Values are percentages of total fatty acids. All data are from this study. –, Not detected. B and H indicate that the double bonds are in different locations. Fatty acid identities were determined using the TSBA40 database in the Sherlock Microbial Identification System version 6.1.

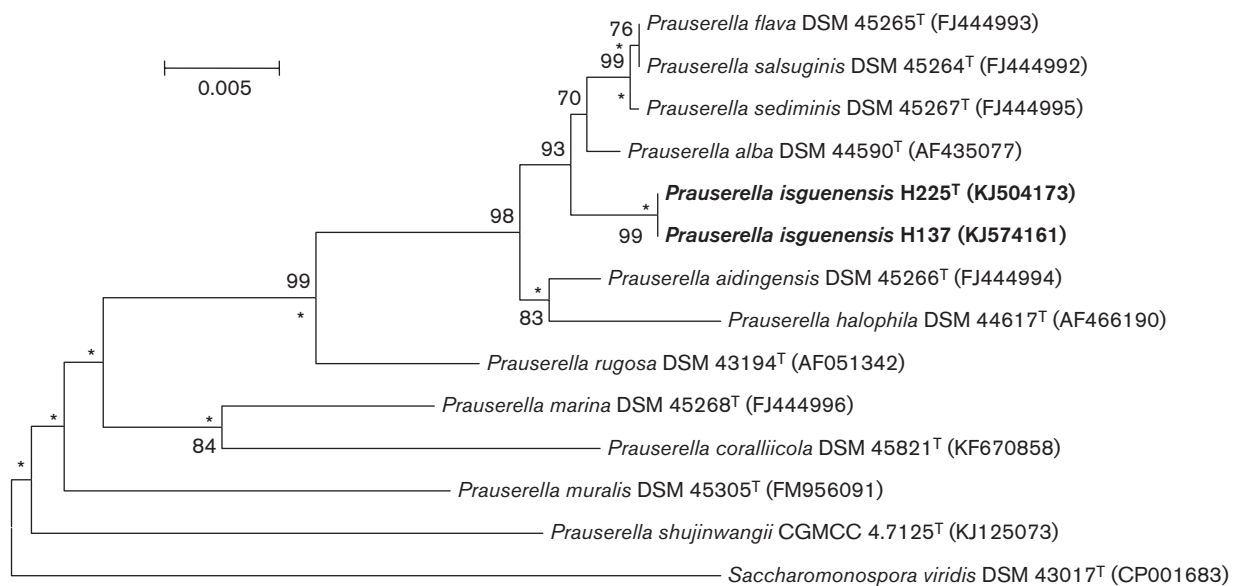
Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7
iso-C <sub>14:0</sub>	1.45	2.62	0.58	–	1.67	0.46	0.49
C <sub>15:0</sub>	3.10	3.76	2.15	1.36	2.99	2.36	1.66
iso-C <sub>15:0</sub>	1.55	3.45	0.82	1.50	0.78	1.08	1.26
anteiso-C <sub>15:0</sub>	0.92	2.32	0.26	–	–	0.32	0.28
C <sub>15:1</sub> B	2.81	3.92	1.54	1.01	2.35	0.72	1.03
C <sub>16:0</sub>	5.67	3.38	12.13	9.09	1.04	17.99	13.61
iso-C <sub>16:0</sub>	38.40	33.03	37.23	25.98	56.86	42.83	37.33
iso-C <sub>16:0</sub> 2-OH	11.02	5.54	13.77	10.56	10.86	5.46	11.64
10-methyl C <sub>16:0</sub>	–	1.12	–	–	–	0.58	0.44
iso-C <sub>16:1</sub> H	8.06	6.35	2.52	7.00	11.95	1.40	2.45
C <sub>16:1</sub> <i>cis</i> 9	9.59	6.05	11.44	8.22	1.59	4.31	10.91
C <sub>17:0</sub>	3.17	3.74	3.37	2.83	2.20	6.87	3.69
iso-C <sub>17:0</sub>	0.83	1.64	1.00	1.50	0.51	1.91	1.93
anteiso-C <sub>17:0</sub>	4.93	11.47	3.60	8.63	0.48	6.21	4.92
anteiso-C <sub>17:0</sub> 2-OH	–	1.40	–	3.70	–	–	–
C <sub>17:1</sub> <i>cis</i> 9	7.74	7.91	5.86	6.61	5.01	3.57	5.37
C <sub>18:0</sub>	–	–	2.02	–	–	2.21	1.03
iso-C <sub>18:0</sub>	–	–	0.56	–	0.29	0.82	0.55
C <sub>18:1</sub> <i>cis</i> 9	0.76	0.34	0.92	3.97	0.24	0.45	0.92

distinguished from the type strains of *P. flava*, *P. alba*, *P. aidingensis*, *P. salsuginis* and *P. sediminis*. We therefore suggest that strains H225<sup>T</sup> and H137 represent a novel species of the genus *Prauserella*, for which the name *Prauserella isguenensis* sp. nov. is proposed.

**Description of *Prauserella isguenensis* sp. nov.**

*Prauserella isguenensis* (is.guen.en'sis. N.L. fem. adj. *isguenensis* pertaining to Béni-Isguen, the source of the soil from which the type strain was isolated).

Gram-stain-positive, aerobic, non-motile actinobacterium. The colour of the substrate mycelium is light brownish yellow on ISP 2, very pale yellow on nutrient agar, beige on complex medium agar and white on ISP 4. The substrate mycelium fragments into irregular rod-shaped elements. The aerial mycelium is white on all media tested and forms short to long spore chains at maturity, which are straight to flexuous, and spores are non-motile. Diffusible pigments are not produced. Temperature and pH ranges for growth are 20–45 °C (optimal at 30–37 °C) and pH 5.0–9.0 (optimal at pH 7.0). The NaCl concentration range for growth is 5–25 % (w/v), with optimal growth occurring at 7–15 % (w/v). Grows with and produces acid from adonitol, L-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, raffinose, L-rhamnose, D-ribose, sucrose and D-xylose, but not cellobiose, erythritol, *myo*-inositol, D-mannose, melezitose, melibiose, salicin, D-sorbitol or trehalose. Hydrolyses starch, tyrosine, Tween 80 and xanthine, but not adenine, aesculin, arbutin,



**Fig. 1.** Neighbour-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the taxonomic position of strains H225<sup>T</sup> and H137 relative to other species of the genus *Prauserella*. Numbers at nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1000 resamplings (only values >50 % are shown). Asterisks indicate nodes also recovered with the maximum-likelihood and maximum-parsimony methods. *Saccharomonospora viridis* DSM 43017<sup>T</sup> was used as an outgroup. Bar, 0.005 substitutions per site.

casein, gelatin, guanine, hypoxanthine or testosterone. Acetate, butyrate, citrate, pyruvate and succinate are decarboxylated, but not benzoate, oxalate, propionate or tartrate. Utilizes L-alanine and L-proline as source of nitrogen, but not L-serine. Resistant to lysozyme but not to erythromycin, tetracycline or nalidixic acid. Whole-cell hydrolysates contain *meso*-diaminopimelic acid, and arabinose and galactose as major whole-cell sugars. The diagnostic phospholipid is phosphatidylethanolamine. The major menaquinone is MK-9(H<sub>4</sub>). The major fatty acid is iso-C<sub>16:0</sub>. Mycolic acids are absent.

The type strain is H225<sup>T</sup> (=DSM 46664<sup>T</sup>=CECT 8577<sup>T</sup>), which was isolated from a Saharan soil sample collected from the arid region of Ahbas at Béni-Isguen (Ghardaïa, Algeria). The DNA G+C content of the type strain is 70.4 mol%.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge the technical assistance of Gabriele Pötter and Bettina Sträubler (both at DSMZ).

## References

- Becker, B., Lechevalier, M. P., Gordon, R. E. & Lechevalier, H. A. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol* **12**, 421–423.
- Chun, J., Bae, K. S., Moon, E. Y., Jung, S. O., Lee, H. K. & Kim, S. J. (2000). *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1909–1913.
- De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* **12**, 133–142.
- Di Marco, A. & Spalla, C. (1957). La produzione di cobalamine da fermentazione con una nuova specie di *Nocardia*: *Nocardia rugosa*. *Giorn Microbiol* **14**, 24–30 (in Italian).
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368–376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Fitch, W. M. (1977). On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am Nat* **111**, 223–257.
- Goodfellow, M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J Gen Microbiol* **69**, 33–80.
- Gordon, R. E. & Barnett, D. A. (1977). Resistance to rifampin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomic tool. *Int J Syst Bacteriol* **27**, 176–178.
- Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E. & Pang, C. H. N. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol* **24**, 54–63.
- Hsu, S. C. & Lockwood, J. L. (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl Microbiol* **29**, 422–426.
- Huss, V. A. R., Festl, H. & Schleifer, K. H. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* **4**, 184–192.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp. 21–132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- Kelly, K. L. (1964). *Inter-Society Color Council – National Bureau of Standards Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors*. Washington, DC: US Government Printing Office.
- Kim, S. B. & Goodfellow, M. (1999). Reclassification of *Amycolatopsis rugosa* Lechevalier et al. 1986 as *Prauserella rugosa* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 507–512.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H. & other authors (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716–721.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111–120.
- Kroppenstedt, R. M. (1982). Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase (RP18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases. *J Liq Chromatogr* **5**, 2359–2367.
- Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* **20**, 435–443.
- Lechevalier, M. P., Prauser, H., Labeda, D. P. & Ruan, J.-S. (1986). Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 29–37.
- Li, W.-J., Xu, P., Tang, S.-K., Xu, L.-H., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. & Jiang, C.-L. (2003). *Prauserella halophila* sp. nov. and *Prauserella alba* sp. nov., moderately halophilic actinomycetes from saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1545–1549.
- Li, Y., Tang, S.-K., Chen, Y.-G., Wu, J.-Y., Zhi, X.-Y., Zhang, Y.-Q. & Li, W.-J. (2009). *Prauserella salsuginis* sp. nov., *Prauserella flava* sp. nov., *Prauserella aidingensis* sp. nov. and *Prauserella sediminis* sp. nov., isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2923–2928.
- Liu, M., Zhang, L., Ren, B., Yang, N., Yu, X., Wang, J., Ding, L., Liu, X., Liu, Z. & other authors (2014). *Prauserella shujinwangii* sp. nov., from a desert environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 3833–3837.
- Marchal, N., Bourdon, J. L. & Richard, C. L. (1987). *Les Milieux de Culture pour l'Isolément et l'Identification Biochimique des Bactéries*. Paris: Doin Press.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159–167.
- Minnikin, D. E., Patel, P. V., Alshamaony, L. & Goodfellow, M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **27**, 104–117.
- Minnikin, D. E., Hutchinson, I. G., Caldicott, A. B. & Goodfellow, M. (1980). Thin-layer chromatography of methanolsates of mycolic acid-containing bacteria. *J Chromatogr A* **188**, 221–233.
- Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* **2**, 233–241.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M. & Stackebrandt, E. (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 1088–1092.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.



- Sasser, M. (1990).** *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids*, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
- Schäfer, J., Martin, K. & Kämpfer, P. (2010).** *Prauserella muralis* sp. nov., from the indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 287–290.
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313–340.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Wang, J., Li, Y., Bian, J., Tang, S.-K., Ren, B., Chen, M., Li, W.-J. & Zhang, L.-X. (2010).** *Prauserella marina* sp. nov., isolated from ocean sediment of the South China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 985–989.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. & other authors (1987).** International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463–464.
- Wu, J.-F., Li, J., You, Z.-Q. & Zhang, S. (2014).** *Prauserella coralliicola* sp. nov., isolated from the coral *Galaxea fascicularis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 3341–3345.

# *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov., a Novel Halophilic Actinomycete Isolated from Northern Sahara

Rafika Saker · Nouredine Bouras · Atika Meklat ·  
Abdelghani Zitouni · Peter Schumann · Cathrin Spröer ·  
Hans-Peter Klenk · Nasserine Sabaou

Received: 24 September 2014 / Accepted: 29 October 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** A novel halophilic, filamentous actinomycete, designated H254<sup>T</sup>, was isolated from a Saharan soil sample collected from Biskra (Northern Sahara), and subjected to a polyphasic taxonomic characterization. The strain is Gram-positive, aerobic, and halophilic, and the optimum NaCl concentration for growth is 15–20 % (w/v). The cell-wall hydrolysate contained *meso*-diaminopimelic acid, and the diagnostic whole-cell sugars were arabinose and galactose. The diagnostic phospholipid detected was phosphatidylcholine, and MK-9(H<sub>4</sub>) was the predominant menaquinone. The major fatty acid profiles were anteiso-C<sub>17:0</sub> (32.8 %), C<sub>15:0</sub> (28 %), and iso-C<sub>17:0</sub> (12.3 %). Comparative analysis

of the 16S rRNA gene sequences revealed that the strain H254<sup>T</sup> formed a well-separated sub-branch within the radiation of the genus *Actinopolyspora*, and the microorganism was most closely related to *Actinopolyspora saharensis* DSM 45459<sup>T</sup> (99.2 %), *Actinopolyspora halophila* DSM 43834<sup>T</sup> (99.1 %), and *Actinopolyspora algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup> (99.0 %). Nevertheless, the strain had relatively lower mean values for DNA–DNA relatedness with the above strains (57.2, 68.4, and 45.6 %, respectively). Based on phenotypic features and phylogenetic position, we propose that strain H254<sup>T</sup> represents a novel species of the genus *Actinopolyspora*, for which the name *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov. is proposed. The type strain of *A. biskrensis* is strain H254<sup>T</sup> (=DSM 46684<sup>T</sup> =CECT 8576<sup>T</sup>).

The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequences of strains H254<sup>T</sup> is KJ504178.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00284-014-0740-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Saker · N. Bouras · A. Meklat · A. Zitouni · N. Sabaou (✉)  
Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM),  
Ecole Normale Supérieure, Kouba, Alger, Algeria  
e-mail: sabaou@yahoo.fr

N. Bouras  
Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de  
la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455,  
Ghardaïa 47000, Algeria

A. Meklat  
Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de  
la Vie, Université Saâd Dahleb, Blida, Algeria

P. Schumann · C. Spröer · H.-P. Klenk (✉)  
Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms  
and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig,  
Germany  
e-mail: hpk@dsMZ.de

## Introduction

The genus *Actinopolyspora* was firstly described by Gochnauer et al. [9], with the description of *Actinopolyspora halophila* as the type species. At the time of writing, the genus comprises 12 recognized species, all of them are halophilic actinomycetes, namely *A. halophila* [10], *A. mortivallis* [35], *A. xinjiangensis* [11], *A. egyptensis* [14], *A. alba* and *A. erythraea* [34], *A. algeriensis* [24], *A. saharensis*, *A. righensis*, and *A. mzabensis* [25–27], *A. dayingensis* [13], and *A. lacussalsi* [12].

Typically, members of the genus are characterized by fragmentation of both aerial and substrate mycelia into rods and ovoid elements, a chemotype IVA cell-wall (*meso*-diaminopimelic acid without glycine, and arabinose and galactose as diagnostic whole-cell sugars) [21], a phospholipid type PIII (phosphatidylcholine) pattern [22], the presence of MK-9(H<sub>4</sub>) and MK-10(H<sub>4</sub>) as the

**Table 1** Differential characteristics of strain H254<sup>T</sup> compared with its closest relative recognized species of the genus *Actinopolyspora*

Characteristics	1	2	3	4
Growth on ISP 2	-	+	+	+
Utilization of				
D-Cellobiose	+	-	+	+
Erythritol	+	-	-	+
D-Galactose	+	-	+	+
D-Glucose	+	-	+	+
meso-Inositol	-	+	-	+
D-Lactose	+	-	+	+
D-Maltose	+	-	+	+
D-Mannitol	-	+	-	-
D-Mannose	+	-	+	+
Raffinose	+	-	-	+
Salicin	-	+	-	-
Sucrose	+	-	+	+
Decomposition of				
Casein	-	+	-	-
Hypoxanthine	+	+	+	-
Starch	+	-	+	-
Xanthine	+	-	+	-
Production of nitrate reductase	-	-	+	+
Resistance to lysozyme (0.005 % w/v)	+	-	+	+
Growth in the presence of 10 and 30 % of NaCl	+	+	-	+

The phenotypic properties of strains *A. biskrensis* H254<sup>T</sup>, *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>, *A. saharensis* DSM 45459<sup>T</sup>, and *A. algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup> grown under the same conditions were determined in the present study. Taxa 1 Strain H254<sup>T</sup>, 2 *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>, 3 *A. saharensis* DSM 45459<sup>T</sup>, and 4 *A. algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup>. + positive, - negative

predominant menaquinones, the presence of anteiso-C<sub>17:0</sub>, iso-C<sub>15:0</sub>, and iso-C<sub>17:0</sub> as the major fatty acids, and the absence of mycolic acids [10, 11, 34].

During an investigation on halophilic actinomycetes from Saharan soils in Biskra province (Northern Sahara), strain H254<sup>T</sup> was isolated and identified by a polyphasic approach. Based on phenotypic and genotypic characteristics, it is proposed that the strain H254<sup>T</sup> represents a novel species of the genus *Actinopolyspora*, for which the name *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov. is proposed.

## Materials and Methods

### Isolation and Phenotypic Characterization

The strain H254<sup>T</sup> was isolated from a Saharan soil sample collected from Biskra (34°38' North, 5°25' East) in northeast of Algeria, by serial dilution method on complex medium (CM) agar [3] supplemented with 15 % (w/v) NaCl and

50 mg l<sup>-1</sup> actidione. After 3–4 weeks incubation at 30 °C, the strain H254<sup>T</sup> was picked-up, purified, and preserved on CM agar medium at 4 °C. Strain H254<sup>T</sup> was deposited in the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) as strain DSM 46684<sup>T</sup> and in Spanish Type Culture Collection (CECT) as strain CECT 8576<sup>T</sup>.

The colors of substrate and aerial mycelia and any soluble pigments produced were determined by comparison with chips from the ISCC-NBS color charts [17]. Morphological characteristics were observed by light microscopy using 14 days old cultures grown on CM agar medium, International *Streptomyces* Project (ISP 4 and ISP 2) media, and nutrient agar. Growth was tested at pH 5.0–9.0 (at intervals of 1.0 pH units) and at 20, 30, 37, and 45 °C on nutrient agar. NaCl tolerance was studied on nutrient agar containing NaCl at final concentrations of 0–30 % (w/v) (at intervals of 5.0 %). Other physiological characteristics, including utilization of sole carbon and nitrogen sources, decarboxylation of nine organic acids, degradation of adenine, aesculin, arbutin, gelatin, guanine, hypoxanthine, starch, testosterone, Tween 80, tyrosine, and xanthine, and reduction of nitrate and sensibility to lysozyme, were assessed by the media and methods of Locci et al. [23].

### Chemotaxonomic Characterization

Biomass for chemical and molecular studies was obtained by cultivation in shake flasks (250 rpm, 30 °C, 7 days) using complex medium broth (pH 7.0) supplemented with 15 % (w/v) NaCl. The whole-cell sugar pattern and the diagnostic isomers of diamino pimelic acid were analyzed according to the procedures developed by Becker et al. [1] and Lechevalier and Lechevalier [21]. Phospholipids were extracted and identified as described by Minnikin et al. [28]. The cellular fatty acid analysis was performed as described by Sasser [33] using the Microbial Identification System (MIDI). Menaquinones were extracted following the procedure of Minnikin et al. [30], and separated by HPLC [20]. Analysis of mycolic acids was performed using the method of Minnikin et al. [29].

### 16S rRNA Gene Sequence and Phylogenetic Analysis

The genomic DNA of strain H254<sup>T</sup> was extracted with DNA extraction kit (MasterPure<sup>TM</sup> Gram-Positive DNA Purification Kit, Epicentre<sup>®</sup> Biotechnologies, Madison). PCR amplification of the 16S rRNA gene was performed as described by Rainey et al. [31]. PCR products were purified with a PCR product purification kit (Qiagen, Germany). The primers used for sequencing were listed in Coenye et al. [4]. Multiple alignments with sequences of all species of the genus *Actinopolyspora* and calculations of levels of sequence similarity were carried out by the EzTaxon server [18]. Phylogenetic trees were constructed

using the neighbor-joining method [32] with Jukes and Cantor model [16], maximum-likelihood [6] with Kimura's two-parameter model [19], and maximum-parsimony methods [8]. The topology of the phylogenetic tree was evaluated using the bootstrap resampling method of Felsenstein [7] with 1,000 replicates.

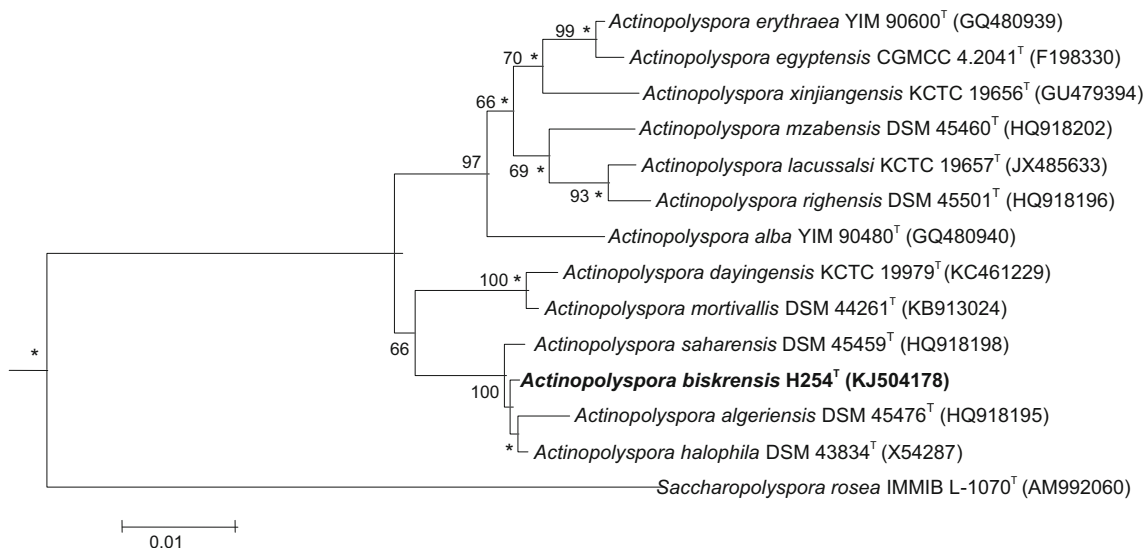
### DNA–DNA Hybridization

For DNA–DNA hybridization, cells were disrupted by a French pressure cell (Thermo Spectronic). DNA in the crude lysate was purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion et al. [2]. Genomic hybridization experiments between strain H254<sup>T</sup> and *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>, *A. saharensis* DSM 45459<sup>T</sup> or *A. algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup> were performed by the method described by De Ley et al. [5] under consideration of the modifications described by Huss et al. [15] using a model Cary 100 Bio UV/VIS-spectrophotometer equipped with a Peltier-thermostatted 6 × 6 multicell changer and a temperature controller with in situ temperature probe (Varian). DNA–DNA hybridization experiments were done in duplicate in 2 × SSC in the presence of 10 % (w/v) formamide at 71 °C.

### Results and Discussion

The strain H254<sup>T</sup> showed good growth on ISP 4 medium, moderate growth on nutrient agar and CM agar media, but no growth was observed on ISP 2 medium. The aerial

mycelium was moderately produced with white to yellowish-white color on these media. The strain formed irregularly branched and fragmented substrate mycelium with dark brown color on ISP 4 medium, pinkish color on nutrient agar, and beige to reddish-orange color on CM agar medium. The diffusible pigments were produced on nutrient agar (pinkish) and ISP 4 (dark brown) media but not on CM agar medium. The aerial mycelium was irregularly branched and formed straight to flexuous chains of 5–15 spores (sometimes 20 spores) per chain. The spores were non-motile and rod-shaped. Strain H254<sup>T</sup> growth occurring in the presence of 10–30 % (w/v) NaCl (optimum 15–20 %), at pH 6–8 (optimum pH 7.0) and at 20–37 °C (optimum 30 °C). The detailed physiological features are indicated in Table 1 and in the species description. Cell-wall hydrolysate of strain H254<sup>T</sup> contained the *meso*-diaminopimelic acid isomer, but not glycine. Whole-cell sugars were arabinose, galactose, and ribose. This is typical of cell wall type IV and whole-cell sugar pattern type A [21]. The major menaquinones were MK-9(H<sub>4</sub>) (62.3 %) and MK-10(H<sub>4</sub>) (28.0 %), and minor amounts of MK-9(H<sub>2</sub>) (3.2 %), MK-9(H<sub>0</sub>) (2.1 %), MK-10(H<sub>6</sub>) (1.2 %), and MK-10(H<sub>2</sub>) (0.8 %) were also detected. The phospholipid profile contained diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, and three unknown glycolipids (Supplement Fig. 1). The fatty acid profiles were composed as follows: anteiso-C<sub>17:0</sub> (32.8 %), iso-C<sub>15:0</sub> (28.0 %), iso-C<sub>17:0</sub> (12.3 %), 9-methyl C<sub>16:0</sub> (8.6 %), anteiso-C<sub>15:0</sub> (7.9 %), and iso-C<sub>16:0</sub> (5.1 %).



**Fig. 1** Phylogenetic tree for species of the genus *Actinopolyspora* calculated from almost complete 16S rRNA gene sequences using Jukes and Cantor [16] evolutionary distance methods and the neighbor-joining method of Saitou and Nei [32]. This illustrates the taxonomic position of strain H254<sup>T</sup> relative to the other species of the genus. Asterisks indicate branches that are conserved when the

neighbor-joining, maximum-parsimony, and maximum-likelihood methods were used in constructing phylogenetic trees. Numbers at nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1,000 resamplings (only values >50 % are shown). *Saccharopolyspora rosea* IMMIB L-1070<sup>T</sup> was used as an outgroup. Bar 1 substitution per 100 nucleotides

Phylogenetic analysis of an almost complete 16S rRNA gene sequence (1,491 bp, GenBank accession number KJ574180) showed that strain H254<sup>T</sup> was related to members of the genus *Actinopolyspora*. Moreover, the 16S rRNA sequence exhibited highest 16S rRNA gene sequence similarity to *A. saharensis* DSM 45459<sup>T</sup> (99.2 %), *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup> (99.1 %), and *A. algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup> (99.0 %). The phylogenetic relationship between strain H254<sup>T</sup> and the other *Actinopolyspora* species is seen in the neighbor-joining (Fig. 1), maximum-parsimony (Supplement Fig. 2), and maximum-likelihood (Supplement Fig. 3) dendrograms.

DNA–DNA relatedness between strain H254<sup>T</sup> and strains *A. saharensis* DSM 45459<sup>T</sup>, *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>, and *A. algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup> has respective mean values of 57.2, 68.4, and 45.6 %, respectively.

Strain H254<sup>T</sup> differs from these three closely related species of *Actinopolyspora* by several physiological characteristics, and also by some chemotaxonomical characteristics (Table 2). Strain H254<sup>T</sup> differs from *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>, which is genetically the closest species (DNA–DNA relatedness of 68.4 %), by 17 physiological characteristics, by the percentage of fatty acid anteiso-C<sub>15:0</sub> (only 7.9 % for H254<sup>T</sup> and 34.6 % for *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>) and anteiso-C<sub>17:0</sub> (32.8 % for H254<sup>T</sup> and only 10.2 % for *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>), by the percentage of menaquinone MK-10(H<sub>4</sub>) (28.0 % for H254<sup>T</sup> and only 10.0 % for *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>), by the presence of diphosphatidylglycerol (DPG), and by the absence of lyso-DPG.

It is evident from the phenotypic, chemotaxonomic, and genetic data that strain H254<sup>T</sup> represents a novel species in the genus *Actinopolyspora*, for which we propose the name *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov.

#### Description of *Actinopolyspora biskrensis* sp. nov

*Actinopolyspora biskrensis* (bis.kren'sis, N.L. fem. adj. *biskrensis* pertaining to Biskra, where the type strain was isolated).

Gram-positive, aerobic, extremely halophilic actinomycete. Aerial mycelium is white to yellowish-white, and forms straight to flexuous chains of 5 to 15 (sometimes 20) rod-shaped and non-motile spores. The color of the substrate mycelium is pinkish on nutrient agar medium, dark brown on ISP 4 medium, and beige to reddish-orange on CM agar medium. The substrate mycelium is well developed and fragments with age into non-motile rods. The diffusible pigments are produced on nutrient agar (pinkish) and ISP 4 (dark brown) media, but not on CM agar medium. Temperature and pH ranges for growth are 20–37 °C (optimal at 30 °C) and pH 6.0–8.0 (optimal at pH 7.0). The NaCl concentration range for growth is 10–30 %, with

**Table 2** Cellular fatty acid, menaquinone, and phospholipid composition of *Actinopolyspora biskrensis* H254<sup>T</sup> in comparison with the closely related species *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>, *A. saharensis* DSM 45459<sup>T</sup>, and *A. algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup>

Chemotaxonomic characteristics	1	2	3	4
Fatty acid composition (%)				
iso-C <sub>14:0</sub>	–	2.4	–	3.4
iso-C <sub>15:0</sub>	28.0	24.1	20.4	17.8
anteiso-C <sub>15:0</sub>	7.9	34.6	9.1	15.8
iso-C <sub>16:0</sub>	5.1	9.3	15.6	15.6
C <sub>16:0</sub>	–	4.7	–	0.5
9-Methyl-C <sub>16:0</sub>	8.6	–	–	2.2
iso-C <sub>17:0</sub>	12.3	7.4	9.3	3.8
anteiso-C <sub>17:0</sub>	32.8	10.2	30.8	31.3
cis9-C <sub>18:1</sub>	–	0.6	–	2.7
Menaquinone composition (%)				
MK-8(H <sub>4</sub> )	–	4	5.9	3.4
MK-9(H <sub>0</sub> )	2.1	–	–	–
MK-9(H <sub>2</sub> )	3.2	2	5.3	9.1
MK-9(H <sub>4</sub> )	62.3	64	22.4	39.1
MK-9(H <sub>6</sub> )	–	3	–	–
MK-10(H <sub>2</sub> )	0.8	–	9.4	5.7
MK-10(H <sub>4</sub> )	28.0	10	29.4	32.1
MK-10(H <sub>6</sub> )	1.2	–	1.9	–
MK-11(H <sub>2</sub> )	–	–	3.0	–
MK-11(H <sub>4</sub> )	–	–	8.3	–
Phospholipid composition				
PC	+	+	+	+
DPG	+	–	+	+
PG	+	+	+	+
PI	–	–	+	+
Lyso-DPG	–	+	–	–

Strains: 1, strain H254<sup>T</sup>; 2, *A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>; 3, *A. saharensis* DSM 45459<sup>T</sup>; 4, *A. algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup>, values are percentages of total fatty acids and menaquinones, –, not detected. Data for fatty acids analyses of all strains were from this study. Data for menaquinones and phospholipids were from this study (strain H254<sup>T</sup>), Gochnauer et al. [9] (*A. halophila* DSM 43834<sup>T</sup>), Meklat et al. [25] (*A. saharensis* DSM 45459<sup>T</sup>) and Meklat et al. [24] (*A. algeriensis* DSM 45476<sup>T</sup>)

optimal growth occurring at 15–20 %. Utilizes adonitol, L-arabinose, D-cellobiose, erythritol, D-fructose, D-galactose, D-glucose, glycerol, D-lactose, maltose, D-mannose, D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, and D-xylose, as sole carbon sources, but not *meso*-inositol, mannitol, D-melezitose, and D-melibiose. Nitrates are not reduced. Aesculin, gelatin, hypoxanthine, starch, Tween 80, and xanthine are hydrolyzed; adenine, arbutin, casein, guanine, testosterone, and tyrosine are not decomposed. H<sub>2</sub>S is not formed. Citrate was decarboxylated, but not acetate benzoate, butyrate, oxalate, propionate, pyruvate, succinate, and tartrate. L-serine was

used as source of nitrogen, but not L-alanine and L-proline. Moreover, the growth occurs in the presence of erythromycin (15 g ml<sup>-1</sup>) and 0.005 % (w/v) lysozyme, but not in the presence of tetracycline (30 g ml<sup>-1</sup>) and nalidixic acid (30 g ml<sup>-1</sup>). Contains *meso*-diaminopimelic acid, as cell-wall diamino acid, arabinose, and galactose as major whole-cell sugars (chemotype IVA). The diagnostic phospholipid is phosphatidylcholine. Mycolic acids are absent. The major menaquinones are MK-9(H<sub>4</sub>) and MK-10(H<sub>4</sub>). The major fatty acids are anteiso-C<sub>17:0</sub>, iso-C<sub>15:0</sub>, and iso-C<sub>17:0</sub>.

The type strain is H254<sup>T</sup> (=DSM 46684<sup>T</sup> =CECT 8576<sup>T</sup>) isolated from a Saharan soil sample collected from Biskra region (northern Sahara).

**Acknowledgments** We would like to gratefully acknowledge the technical assistance of Gabriele Pötter and Bettina Sträubler (both at DSMZ).

**Conflict of interest** The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## References

1. Becker B, Lechevalier MP, Gordon RE, Lechevalier HA (1964) Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol* 12:42–43
2. Cashion P, Holder-Franklin MA, McCully J, Franklin M (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* 81:461–466
3. Chun J, Bae KS, Moon EY, Jung SO, Lee HK, Kim SJ (2000) *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1909–1913
4. Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, Hoste B, Govan JR, Kersters K, Vandamme P (1999) Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:405–413
5. De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* 12:133–142
6. Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368–376
7. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–789
8. Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 20:406–416
9. Gochnauer MB, Leppard G, Komararat P, Kates M, Novitsky T, Kushner DJ (1975) Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol* 21:1500–1511
10. Gochnauer MB, Johnson KG, Kushner DJ (1989) Genus *Actinopolyspora*. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 4. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 2398–2401
11. Guan TW, Liu Y, Zhao K, Xia ZF, Zhang XP, Zhang LL (2010) *Actinopolyspora xinjiangensis* sp. nov., a novel extremely halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Antonie van Leeuwenhoek* 98:447–453
12. Guan TW, Wei B, Zhang Y, Xia ZF, Che ZM, Chen XG, Zhang LL (2013) *Actinopolyspora lacussalsi* sp. nov., a novel extremely halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3009–3013
13. Guan TW, Zhao HP, Che ZM, Zhang XP, Zhang LL (2013) *Actinopolyspora dayingensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a hypersaline lake. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:787–792
14. Hozzein WN, Goodfellow M (2011) *Actinopolyspora egyptensis* sp. nov., a new halophilic actinomycete. *Afr J Microbiol Res* 5:100–105
15. Huss VAR, Festl H, Schleifer KH (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* 4:184–192
16. Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian protein metabolism*, vol 3. Academic Press, New York, pp 21–132
17. Kelly KL (1964) Inter-society color council-national bureau of standards color name charts illustrated with centroid colors. US Government Printing Office, Washington
18. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:716–721
19. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol* 16:111–120
20. Kroppenstedt RM (1982) Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase (RP18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases. *J Liq Chromatogr* 5:2359–2367
21. Lechevalier MP, Lechevalier HA (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* 20:435–443
22. Lechevalier MP, de Bièvre C, Lechevalier HA (1977) Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem Syst Ecol* 5:249–260
23. Locci R (1989) Streptomycetes and related genera. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 2451–2493
24. Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2012) *Actinopolyspora algeriensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil. *Extremophiles* 16:771–776
25. Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013) *Actinopolyspora saharensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil of Algeria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103:771–776
26. Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013) *Actinopolyspora righensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:301–307
27. Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013) *Actinopolyspora mzabensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil of Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3787–3792
28. Minnikin DE, Patel PV, Alshamaony L, Goodfellow M (1977) Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 27:104–117
29. Minnikin DE, Hutchinson IG, Caldicott AB, Goodfellow M (1980) Thin layer chromatography of methanolsates of mycolic acid-containing bacteria. *J Chromatogr* 188:221–233

30. Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M, Schaal A, Parlett JH (1984) An integrated procedure for extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 2:233–241
31. Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E (1996) The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46:1088–1092
32. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
33. Sasser M (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. IDI Inc., Newark
34. Tang SK, Wang Y, Klenk HP, Shi R, Lou K, Zhang YJ, Chen C, Ruan JS, Li WJ et al (2011) *Actinopolyspora alba* sp. nov. and *Actinopolyspora erythraea* sp. nov., isolated from a salt field in China, and reclassification of *Actinopolyspora iraqiensis* AS 4.1193T (Ruan, 1994) as a later heterotypic synonym of *Saccharomonospora halophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1693–1698
35. Yoshida M, Matsubara K, Kudo T, Horikoshi K (1991) *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int J Syst Bacteriol* 41:15–20

# Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans

Rafika Saker · Atika Meklat · Nouredine Bouras ·  
Abdelghani Zitouni · Florence Mathieu · Cathrin Spröer ·  
Hans-Peter Klenk · Nasserddine Sabaou

Received: 25 July 2014 / Accepted: 18 February 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2015

**Abstract** The diversity of culturable halophilic actinobacteria in two Algerian arid ecosystems (M'zab and Zibans) of septentrional Sahara was investigated. A total of 69 halophilic strains were isolated from 19 soil samples. Taxonomy was determined using a polyphasic approach based on morphological, physiological (with the application of numerical taxonomy), chemotaxonomic and molecular investigations. Sequencing of the 16S rRNA gene revealed that the strains belonged to six clusters corresponding to six genera: *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Prauserella*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* and *Streptomonospora*. Some strains were found to represent known species, but others formed distinct phyletic lines. Interestingly, cluster VII, which contained four strains, represents an unknown actinobacterial genus. An assessment of the biological properties of the actinobacterial strains showed moderate to strong antimicrobial activities against fungi and

bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The bioactive potential of strains which did not show any antimicrobial activity on yeast extract-malt extract agar was analyzed based on the genetic background of these strains using polyketide synthase (type I, II and PKSE) and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) gene sequences. Most of the strains harbored NRPS and PKS-II genes, indicating that they might have a great potential to produce bioactive compounds if the laboratory culture conditions were changed.

**Keywords** Halophilic actinobacteria · Algerian arid soils · Numerical taxonomy · Phylogeny · Antagonistic activity

## Introduction

Members of the microbacterial phylum *Actinobacteria* represent the largest reservoir of producers of potentially valuable natural products, such as antitumor and immunosuppressive agents, enzymes, antiparasitics, insecticides, herbicides, antioxidants and, in particular, antibiotics (Solanki et al. 2008). Actinobacteria are extensively distributed in soils and other terrestrial environments, where they have been shown to play an important ecological role in soil nutrient turnover (González et al. 2005). This group of microorganisms is widespread in nature and is able to occupy several extreme ecosystems. For convenience, extremophilic actinobacteria can be conveniently grouped into several groups based on their tolerance/resistance to various environmental factors: acidophilic and alkaliphilic, psychrophilic and thermophilic, halophilic and haloalkaliphilic and xerophilic groups (Jiang and Xu 1993; Al-Tai and Ruan 1994; Selyanin et al. 2005).

Several new taxa (species and genera) of halophilic actinobacteria have been reported (Tang et al. 2011; Chang

---

R. Saker · A. Meklat · N. Bouras · A. Zitouni · N. Sabaou (✉)  
Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole  
Normale Supérieure, Kouba, Algiers, Algeria  
e-mail: sabaou@yahoo.fr

N. Bouras  
Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la  
Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455,  
Ghardaïa 47000, Algeria

F. Mathieu  
LGC UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), Département de Bioprocédés  
et Systèmes Microbiens, ENSAT-INP de Toulouse, Université de  
Toulouse, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, BP 32607,  
31326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France

C. Spröer · H.-P. Klenk  
Leibniz Institute German Collection of Microorganisms and Cell  
Cultures (DSMZ), Inhoffenstraße 7B,  
38124 Braunschweig, Germany



et al. 2012; Guan et al. 2013a, b). Furthermore, many studies performed in arid regions, such as Algerian Sahara, have shown the metabolic richness of the halophilic (or moderately halophilic) actinobacteria which inhabit this special ecosystem. This in turn has led to the detection of many bioactive compounds (Boudjelal et al. 2011; Meklat et al. 2012, 2014).

An alternative approach is the characterization of actinobacterial strains based on metabolic potential by targeting widespread genes involved in the production of bioactive compounds (Anderson et al. 2002; Ayuso-Sacido and Genilloud 2004). For example, modular polyketide synthases [PKSs; modular PKS (PKS-I), interactive PKS (PKS-II; Shen 2003), enediyne polyketide synthase (PKSE)] and non-ribosomal peptide synthetases (NRPS; Schwarzer et al. 2003) have been extensively described as being responsible for the biosynthesis of a broad range of biologically active secondary metabolites in microorganisms such as actinobacteria. Nolan and Cross (1988) recommended exploring new soils and habitats to screen for rare microorganisms capable of producing several antibiotics. In this context, we have continued to investigate halophilic actinobacteria to increase current knowledge on this group of bacteria, particularly in terms of genetic diversity.

The aims of this study were to investigate the biodiversity of culturable halophilic actinobacteria isolated from two Algerian arid ecosystems (M'zab and Zibans) of septentrional Sahara, to evaluate their potential to exhibit different antimicrobial activities and to detect the presence of genes encoding PKS-I, PKS-II, PKSE and NRPS.

## Materials and methods

### Sampling site and sample collection

Soil samples were taken from arid regions of M'zab (358–555 m a.s.l.) and Zibans (110–210 m a.s.l.), which are located in the center and the center-eastern region of Algeria (septentrional Sahara), respectively (Table 1). Surface soil samples (the top 20 cm) were collected and placed in sterile polyethylene bags that were closed tightly and then stored at 4 °C until analysis. A total of 19 samples were collected during the study period.

The soil textures at M'zab and Zibans are loamy sand to sandy loam. The moisture content (at the time of sampling) ranged from 4 to 9 %, the pH was slightly basic (8.0–8.9). The percentages of carbon and nitrogen ranged from 0.32 to 0.80 %, and from 0.04 to 0.06 % at M'zab and Zibans, respectively (very low amounts). The electrical conductivity [1/5 (w/v) soil/water ratio at 25 °C] was variable depending on the sampling location and ranged between 2.5 and 4.2 mS cm<sup>-1</sup> in the moderately saline soils of the M'zab region (except for the highly saline soils of Zelfana: 15.2 and 18.1 mS

cm<sup>-1</sup>) and between 7.8 and 11.9 mS cm<sup>-1</sup> in non-saline soils of the Zibans region.

### Isolation of halophilic actinobacteria

Halophilic actinobacterial strains were isolated from the arid soils by the serial dilution method and culture on selective culture media: complex medium agar (Chun et al. 2000) and chitin–vitamin agar (Hsu and Lockwood 1975) supplemented with NaCl (15 %) and actidione (50 mg L<sup>-1</sup>). After 3–4 weeks of incubation at 30 °C, the actinobacterial strains were picked out, purified and preserved on complex medium agar at 4 °C.

### Morphological studies

Cultural characteristics were determined after 3–4 weeks of growth on International *Streptomyces* Project (ISP) media ISP2 (malt extract 10 g, yeast extract 4 g, glucose 4 g, agar 18 g, distilled water 1000 mL, pH 7.2) and ISP4 (starch 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, agar 18 g, distilled water 1000 mL, pH 7.2) (Shirling and Gottlieb 1966), nutrient agar (peptone 5 g, yeast extract 2 g, meat extract 1 g, agar 18 g, distilled water 1000 mL, pH 7.2) and complex medium agar (Difco casamino acids 7.5 g, yeast extract 10 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 g, sodium citrate 3 g, KCl 1 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O at 4.98 % 1 mL, agar 18 g, distilled water 1000 mL, pH 6.8). All media used for the determination of morphological characteristics were supplemented with 15 % (w/v) NaCl. The color of the substrate and aerial mycelia and any diffusible pigments produced were determined by comparison with ISCC-NBS color charts. The micromorphology and sporulation of selected strains were examined by light microscopy (B1 series; Motic, PR China).

### Physiological studies and numerical taxonomy

Sixty-three physiological tests were performed to characterize the isolated strains, and physiological characteristics were evaluated according to the methods of Locci (1989). The aims of these tests were to assess the assimilation of 23 carbohydrates and derivatives as sole carbon sources; the assimilation of three amino acids as sole nitrogen sources; the degradation of adenine, arbutin, esculin, gelatin, guanine, hypoxanthine, starch, testosterone, Tween 80, tyrosine, xanthine and nine organic acids; the reduction of nitrates; sensitivity to lysozyme (0.005 %); growth at different concentrations of NaCl (0, 7, 10, 15, 20, 25, 30 % w/v), at different pH (5, 7, 9) and at two different temperatures (30, 45 °C); growth in the presence of erythromycin (15 mg L<sup>-1</sup>), tetracycline (30 mg L<sup>-1</sup>) and nalidixic acid (30 mg L<sup>-1</sup>). All media contained 15 % (w/v) NaCl (except for the NaCl concentration tests).

**Table 1** Location of sampling and the number of strains collected

Region	Collection place	Sample	Number of strains	Strains
M'zab	Ahbas (32°27'N, 3°41'E)	AHS1	19	H139, H141, H145, H147, H148, H149, H150, H151, H154, H155, H159, H195, H196, H197, H198, H199, H200, H202, H225
		AHS2	3	H142, H156, H160
		PAL3	3	H133, H137, H229
	Aberda (32°27'N, 3°40'E)	AB2	7	H208, H176, H178, H181, H182, H203, H206
	Inghid (32°25'N, 3°40'E)	PAL2	3	H243, H244, H245.
	Azrar (32°20'N, 3°44'E)	AZ1	3	H165, H215, H224
		AZ2	5	H167, H168, H212, H213, H169
	Awrir (32°21'N, 3°44'E)	AW	1	H220
	Oudjoujen (32°28'N, 3°41'E)	PAL1	2	H239, H240
		AI	1	H218
	Oued Ntissa (32°46'N, 3°70'E)	ALL1	1	H247
		ALL2	1	H248
	Djaber (32°28'N, 3°41'E)	DJ	3	H216, H217, H223.
	Zelfana (32°23'N, 4°13'E)	ZF1	1	H227
		ZF2	5	H231, H232, H233, H234, H238
ZF5		1	H126	
Zibans	Sidi Khaled (34°23'N, 4°59'E)	SK2	1	H249
		SK3	1	H250
	Lioua (34°38'N, 5°25'E)	LIO	8	H254, H255, H256, H257, H258, H259, H260, H261

The results of the physiological study were analyzed by numerical taxonomy. Data on phenetic characters were coded in a binary system (1/0). The degree of similarity between the studied halophilic strains was calculated by simple matching coefficient ( $S_{SM}$ ), and clustering was performed by the unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA) using average linkages in the SPSS package (v.16.0.1; SPSS Inc., Chicago, IL) as described by Meklat et al. (2011).

#### Chemical studies of cell constituents

Biomass for the chemical and molecular studies of the isolated actinobacterial strains was obtained by cultivation in flasks (250 rpm) containing complex medium broth (pH 7.2) supplemented with 15 % (w/v) NaCl, and incubation with shaking (250 rpm) at 30 °C for 1 week. Diaminopimelic acid (DAP) isomers and whole-cell sugar pattern were analyzed according to the methods of Becker et al. (1964) and Lechevalier and Lechevalier (1970), respectively.

#### DNA extraction, amplification and sequencing

The actinobacterial colonies were removed aseptically and transferred to 1.5-mL sterile Eppendorf tubes. The DNA was extracted according to the method of Liu et al. (2000). The 16S rRNA gene was amplified by PCR with a MP Biomedical kit (MP Biomedicals, USA) using the primers 27F (5'-AGAG

TTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3') in a thermocycler (My Cycler™; Bio-Rad, USA). Amplification was carried out in a final volume of 50 µL of reaction mixture consisting of 25–50 ng of genomic DNA, 0.5 µM of each primer (27F and 1492R), 1×PCR buffer containing MgCl<sub>2</sub> (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % Triton X-100, 0.2 mg mL<sup>-1</sup> bovine serum albumin), 200 µM mixture of desoxynucleoside triphosphate (dNTP) and 1.5 U Taq DNA polymerase. The conditions of the PCR were standardized and consisted of an initial denaturation at 98 °C for 4 min followed by 30 cycles of amplification (denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 52 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min), with a final extension cycle for 10 min at 72 °C. The PCR product was analyzed in a 0.8 % agarose gel, and the fragment was separated by electrophoresis at 100 V for 60 min in TAE buffer. The bands were observed under UV light. The primers used for sequencing are listed in Coenye et al. (1999).

#### 16S rRNA gene phylogenetic analyses

The sequences obtained were compared with sequences present in public sequence databases as well as with those in the EzTaxon-e database server (Kim et al. 2012). All sequences were manually aligned with reference sequences. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 5 (Tamura et al. 2011). A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method of Saitou and Nei (1987)

with the model of Jukes and Cantor (1969). The resulting topology of the trees was evaluated by bootstrap analysis on 1000 replicates.

#### Evaluation of antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the halophilic strains was evaluated by the cylinder plate method against *Staphylococcus aureus* S1, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226, *Candida albicans* M3, *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (formerly *Mucor ramannianus*), *Penicillium expansum* PE1 and *Aspergillus carbonarius* M333. The actinobacterial strains were grown on ISP2 medium supplemented with 15 % (w/v) NaCl at 30 °C. After 12 days of incubation, cylinder agar samples of actinobacterial strains were placed on the surface of ISP2 medium (without NaCl) seeded with the target microorganisms. Inhibition zones were measured after 24 h at 30 °C for bacteria and yeasts and after 36–48 h at 30 °C for filamentous fungi. A control cylinder of ISP2 medium containing only 15 % (w/v) NaCl was used for each target microorganisms.

#### Detection of PKS-I, PKS-II, PKSE and NRPS

Genes for PKS-I, PKS-II, PKSE and NRPS were amplified by PCR from genomic DNA using the degenerate primer pairs K1F/M6R, KS $\alpha$ /KS $\beta$ , EdyA/EdyE and A3F/A7R, respectively, according to methods described previously (Metsä-Ketelä et al. 1999; Ayuso-Sacido and Genilloud 2004; Liu et al. 2003). Each reaction mixture consisted of 20–40 ng DNA template (obtained by the method of Liu et al. 2000), 0.4  $\mu$ M of dNTP mixture, 2  $\mu$ M of each primer, 1 $\times$ buffer containing MgCl<sub>2</sub> and 2.5 U of Taq DNA polymerase and 5 % dimethylsulfoxide. The PCR amplification program consisted of an initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles of amplification (a denaturation step at 94 °C for 1 min, an annealing step of 1 min at 57 °C with K1F/M6R, at 58 °C with KS $\alpha$ /KS $\beta$ , at 62 °C with EdyA/EdyE and at 57 °C with A3F/A7R and an extension of 2 min at 72 °C, with a final extension at 72 °C for 10 min. All amplification products were examined by electrophoresis in agarose gel (0.8 %), and bands of 1200–1400, 600, 1400 and 700–800 bp were classified as products of the PKS-I, PKS-II, NRPS and PKSE genes, respectively.

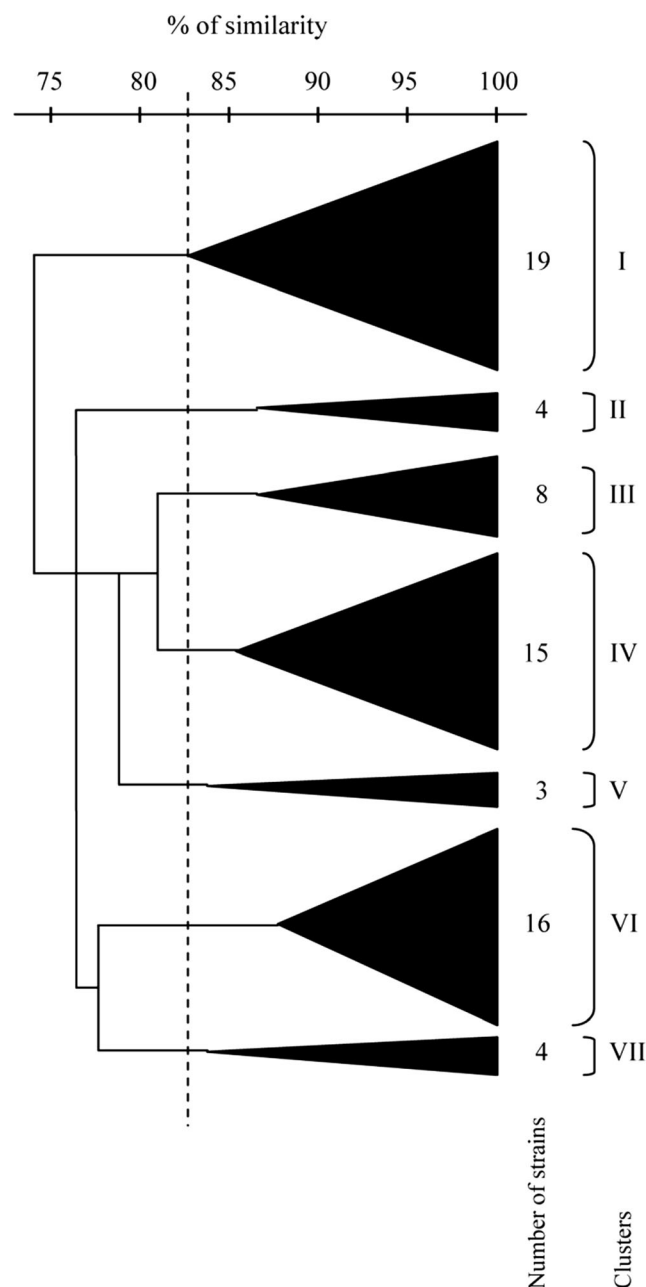
## Results and discussion

#### Phenotypic and chemotaxonomic studies

According to the tests on morphology, chemotaxonomy and physiology, including halophilism, the 69 isolated

actinobacterial strains were tentatively classified into several genera or groups. The physiological tests (numerical taxonomy), based on the similarity  $S_{SM}$  coefficient and on UPGMA clustering classified the isolates, at the 83 % similarity (S) level, into seven clusters, designated I–VII (Fig. 1).

As shown in Fig. 1, Cluster IV includes 15 strains. These strains produced a cream or sometimes pinkish aerial mycelium which fragmented irregularly into long chains of rod-shaped and non-motile spores. The substrate mycelium, cream



**Fig. 1** Dendrogram derived from the similarity (simple matching) coefficient ( $S_{SM}$ ), unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA) analysis based on 63 unit characters, showing the relationships between the 69 halophilic actinobacterial strains isolated from the M'zab and Zibans regions

to non-colored, was more or less fragmented into coccoid and bacillary elements. The peptidoglycan of these cells contained the DL-isomer of DAP, and the whole-cell hydrolysates contained glucose, ribose and sometimes galactose, indicating wall chemotype IIIC (Lechevalier and Lechevalier 1970). These properties are characteristic of *Nocardiopsis*, a genus which contains several species of halophilic or halotolerant actinobacteria (Hozzein and Trujillo 2012). These strains grew in the presence of 7–20 % NaCl and were distinguished from the other clusters by their ability to degrade adenine and by their sensitivity to erythromycin ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Cluster V (Fig. 1) comprises three strains, each with aerial mycelium with the same morphological characteristics and also the same wall chemotype as cluster IV, with the exception of the production of isolated spores in the substrate mycelium. These strains grew in the presence of 7–20 % NaCl. These properties are characteristic of *Streptomonospora*, a genus in which all species are halophilic (Cui 2012). Strains of this cluster were the only strains able to degrade ribose.

Cluster VI (Fig. 1) contains 16 strains, most of which produced blue-green aerial mycelium (although some formed a green aerial spore mass) and produced non-motile, single spores that were sessile or borne on very short sporophores. The non-fragmenting substrate mycelium had either a blue-green or cream coloration. All 16 strains had wall chemotype IV, i.e., peptidoglycan contained the DL-isomer of DAP and whole-cell hydrolysates contained arabinose and galactose (sometimes with ribose and glucose). These strains grew in the presence of 7–15 % or 7–20 % NaCl and probably belong to the genus *Saccharomonospora*, which includes halophilic and halolerant species (Kim 2012). These 16 strains were distinguished from other clusters by their inability to degrade hypoxanthine.

Cluster II (Fig. 1) contains four strains with a nocardioform aspect, with white to cream aerial mycelium, sterile (or less fragmented) and a whitish, cream or yellow substrate mycelium fragmented excessively into non-motile coccoid and rod elements. These strains, which are halophilic or halotolerant, have wall chemotype IVA (arabinose and galactose). They grew in the presence of 0–20 % or 7–25 % NaCl. These strains would appear to belong to the genus *Prauserella*, which contains many species that are known to be halophilic or halotolerant (Kim and Goodfellow 2012a). Strains of this cluster were the only strains able to degrade mannitol, but they were unable to degrade milk casein or to produce nitrate reductase.

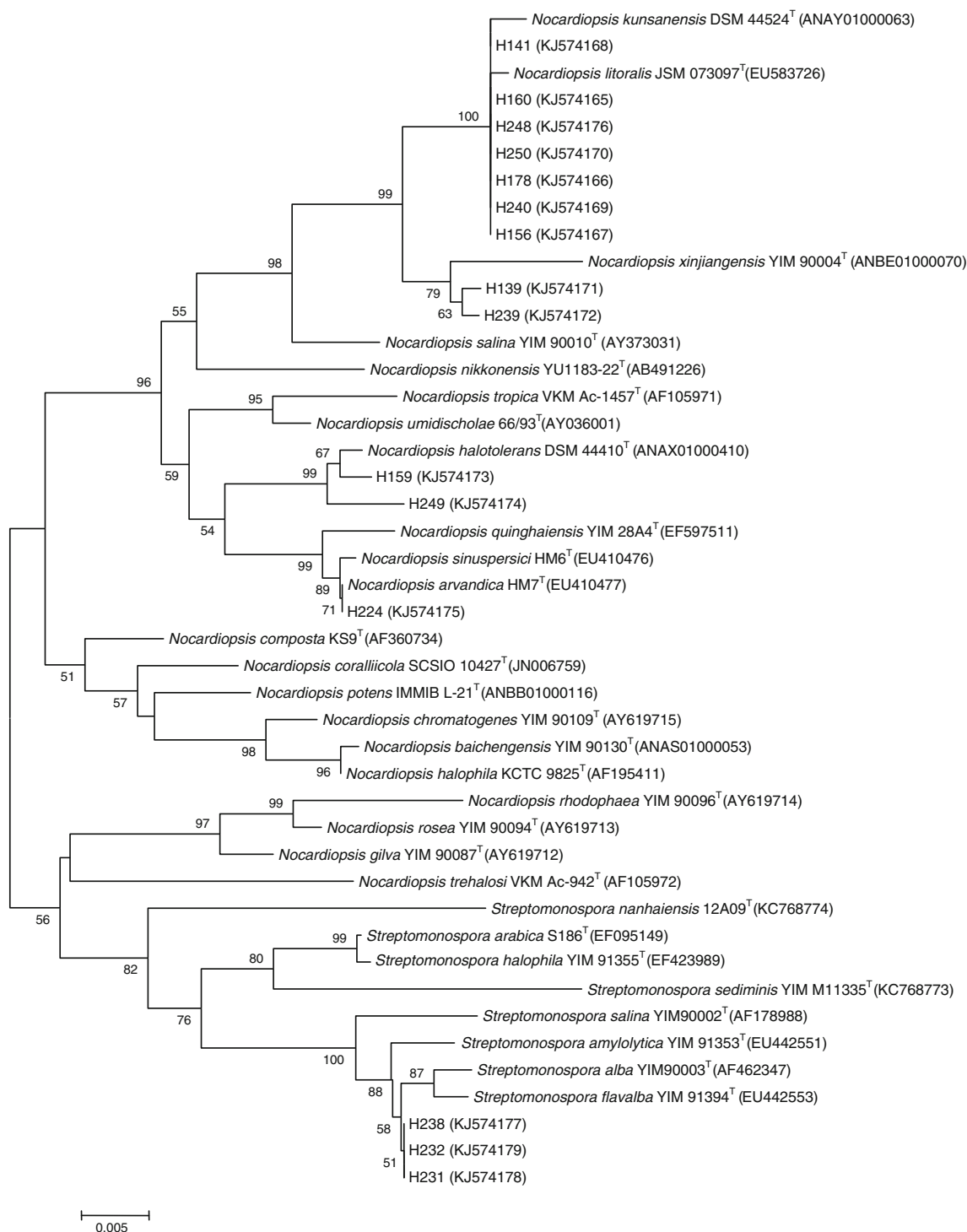
Isolates classified into clusters I (19 strains), III (8 strains) and VII (4 strains) (Fig. 1) had a white to cream aerial mycelium, which produced spore chains (5–30 spores per chain), non-motile, often in rod (cluster I), ovoid (cluster III) or rounded elements (cluster VII). The substrate mycelium was whitish to cream and fragmented into coccoid and rod-like elements. These strains had wall chemotype IVA

(peptidoglycan contained the DL-isomer of DAP, and whole-cell hydrolysates contained arabinose, galactose, glucose, ribose and sometimes mannose). These strains grew in the presence of 7–30 %, 7–25 % or 10–30 % NaCl. The genera that have these characteristics and which are halophilic or salt tolerant are *Actinopolyspora* (all species are halophilic) (Trujillo and Goodfellow 2012) and *Saccharopolyspora* (some species are halophilic or halotolerant) (Kim and Goodfellow 2012b). Strains of cluster I were the only strains to use adonitol as a sole carbon source, strains of cluster III were the only strains which assimilated erythritol and strains of cluster IV were the only strains to assimilate gelatin, arabinose and xylose.

#### Assessment of diversity based on 16S rRNA gene analyses

From a total of 69 actinobacteria, 58 strains belonging to different physiological groups (clusters) were subjected to molecular analysis. The resulting 16S rRNA gene sequences were compared with sequences present in the public sequence databases and in the EzTaxon database server; they have been deposited in GenBank under the accession numbers KJ574145–KJ574163, KJ574165–KJ574179, KJ574181–KJ574187, KJ574189–KJ574203, KJ504173, KJ504178 and KJ504174. A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method of Saitou and Nei (1987) with the model of Jukes and Cantor (1969). The topologies of the trees were evaluated by bootstrap analysis. Almost all of the nodes leading to actinobacterial strains studied were supported by high bootstrap values and should be considered significant (Figs. 2–4). A perfect similarity between the physiological and phylogenetic analysis was observed.

Similarly, it was confirmed that the isolates in cluster IV belonged to the genus *Nocardiopsis*. The strains of *Nocardiopsis* formed a distinct phylogenetic line within the tree (Fig. 2). Strains H159 and H249 were related to *Nocardiopsis halotolerans* with 99.4 and 99.7 % similarity, respectively, strains H139 and H239 were assigned to *N. xinjiangensis* with 99.2 and 99.3 % similarity, respectively, while the remaining six strains were related to *N. litoralis* (similarity 99.7–99.9 %). High 16S rRNA similarities were found between representatives of validly published *Nocardiopsis* species, such as the type strains of *Nocardiopsis valliformis* and *N. exhalans* (99.9 %) (Yang et al. 2008), *N. sinuspersici* and *N. arvandica* (99.9 %) (Hamedi et al. 2011), *N. halophila* and *N. baichengensis* (99.9 %) (Li et al. 2006), *N. litoralis* and *N. kunsanensis* (99.6 %) (Chun et al. 2000) and *N. metallicus* and *N. exhalans* (99.4 %) (Schippers et al. 2002). Thus, three strains of *Nocardiopsis* isolated from Algerian arid soils (H159, H139 and H239) that have similarities of <99.5 % may belong to a new species. All *Nocardiopsis* strains were isolated from the moderately saline soils of the M'zab region, with the exception of H249 (closely related to *N. halotolerans*)



**Fig. 2** Neighbor-joining (NJ) tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships between *Nocardioopsis* and *Streptomonospora* isolates, and between these and their nearest phylogenetic neighbors. Bootstrap values of >50 % are indicated at nodes. Bar: 0.005 substitution per nucleotide position

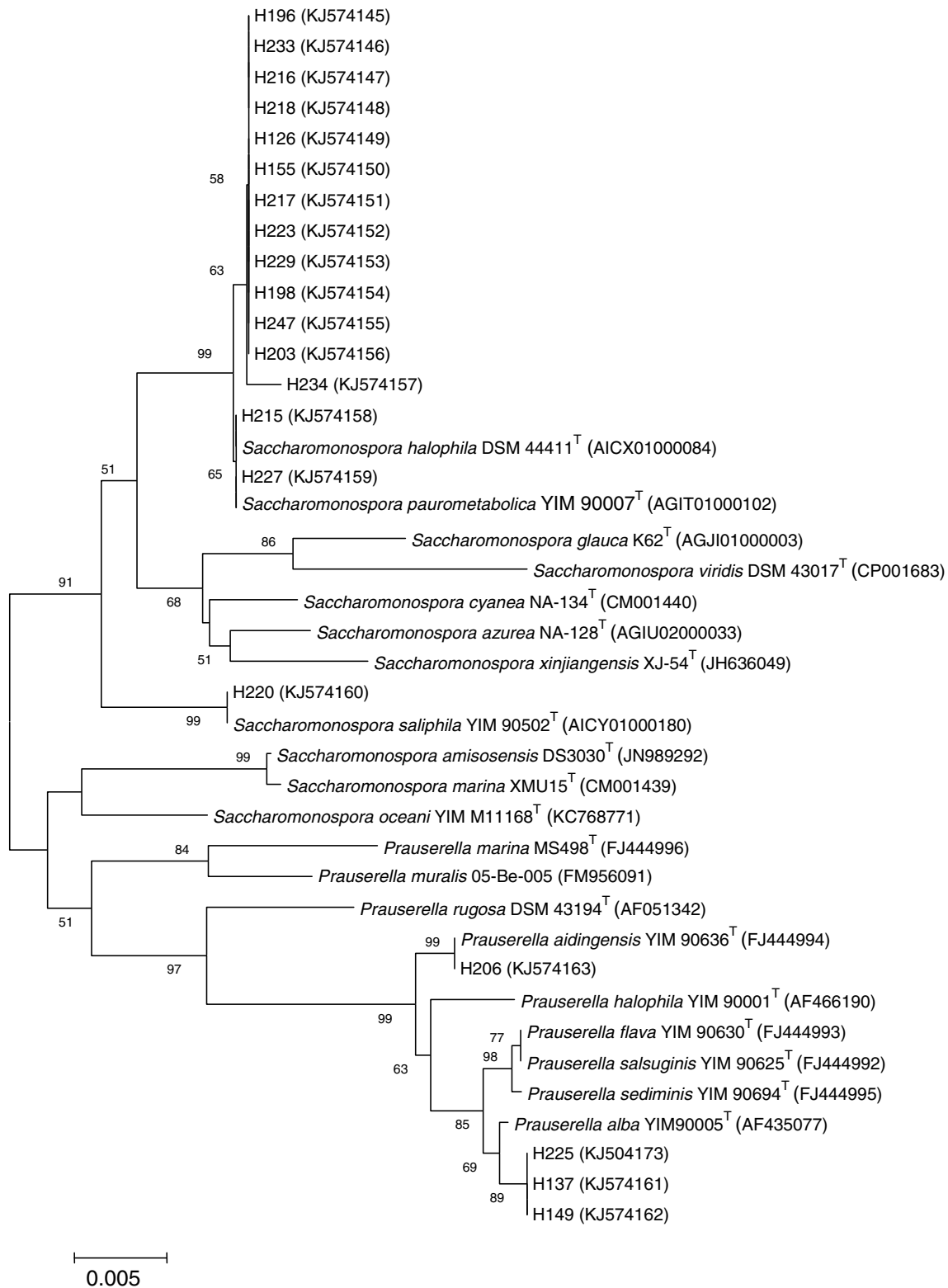
and H250 (closely related to *N. kunsanensis* and *N. litoralis*) which were isolated from saline soils of the Zibans region.

Phylogenetic analysis showed that cluster V represents the genus *Streptomonospora* (Fig. 2). Two strains of *Streptomonospora* (H238, H231) were assigned to *Streptomonospora amylolytica* with 99.4 % similarity, and

strain H232 was related to *S. alba* with 99.5 % similarity. These 16S rRNA sequence similarities are below or approximately the same as the similarities between closely related *Streptomonospora* species, such as *Streptomonospora halophila* and *S. arabica* (99.9 %), *S. flavalba* and *S. alba* (99.7 %), *S. flavalba* and *S. amylolytica* (99.4 %) and

*S. amylolytica* and *S. alba* (99.3 %) (Cai et al. 2009). This result suggests that strains H238, H231 and H232 belong to

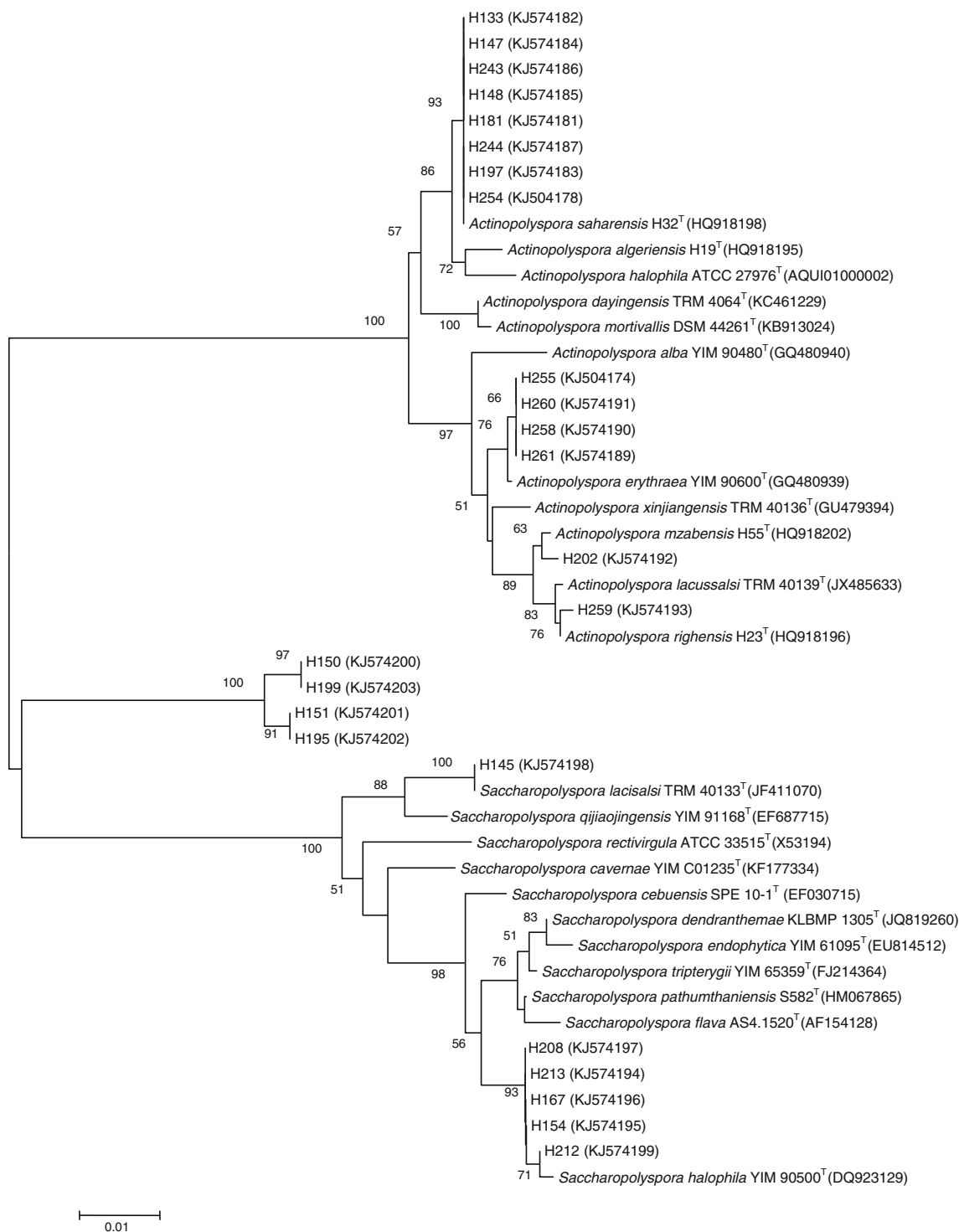
new species. All *Streptomonospora* strains were isolated from highly saline soils of Zelfana (M'zab region).



**Fig. 3** NJ tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships between *Saccharomonospora* and *Prauserella* isolates, and between these and their nearest phylogenetic neighbors. Bootstrap values of >50 % are indicated at nodes. Bar: 0.005 substitution per nucleotide position

The 16S rRNA gene sequences of *Saccharomonospora* strains (cluster VI) formed a distinct cluster with the type strain of *Saccharomonospora paurometabolica* (Fig. 3) and shared a 16S rRNA gene similarity with the latter

of 99.4–99.7 %. Strain H220, however, was 100 % identical to *S. saliphila*. Some species of *Saccharomonospora* have high similarities between them, as in the case of *Saccharomonospora amisosensis* and *S. marina* (99.6 %)



**Fig. 4** NJ tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships between *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora* and isolates from an unknown genus, and between these and their nearest

phylogenetic neighbors. Bootstrap values of >50 % are indicated at nodes. Bar: 0.01 substitution per nucleotide position

**Table 2** Antimicrobial activities of the halophilic actinobacterial strains isolated in this study

Strain	Activity <sup>a</sup> (mm) against:							
	<i>Staphylococcus aureus</i> S1	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 639c	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> M3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	<i>Penicillium expansum</i> PE1	<i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333
H126	–	–	–	–	–	–	16	18
H133	–	–	–	16	–	–	20	20
H137	–	–	–	18	20	–	20	28
H139	–	–	14	20	30	–	24	38
H141	–	–	15	21	17	14	28	30
H142	–	–	16	18	16	–	24	26
H148	–	–	–	18	30	–	21	22
H149	–	–	–	17	40	18	34	22
H154	–	–	–	–	28	15	28	19
H156	18	20	18	21	26	–	28	22
H159	–	–	–	18	17	16	29	20
H160	18	20	18	19	18	–	27	15
H165	–	–	–	24	21	17	26	30
H167	–	–	–	18	28	–	30	23
H168	–	–	–	–	28	–	33	20
H169	–	–	–	15	19	–	36	20
H178	–	–	–	18	18	15	28	28
H180	–	–	–	22	24	16	25	28
H181	–	–	–	19	–	–	20	26
H182	–	–	–	18	–	–	21	26
H197	–	–	–	17	21	–	18	19
H199	–	–	–	–	–	–	–	20
H206	–	–	–	17	24	22	24	19
H208	–	–	–	–	24	14	19	18
H212	–	–	–	–	–	–	34	19
H220	–	–	–	18	20	16	28	22
H224	–	–	–	20	15	20	23	29
H225	–	–	–	20	28	24	28	22
H227	–	–	–	–	–	–	–	18
H233	–	–	–	–	–	–	20	18
H239	–	–	–	17	–	15	23	19
H240	17	17	17	18	24	17	23	19
H243	–	–	–	–	28	–	28	17
H244	–	–	–	16	–	–	25	18
H245	–	–	–	14	–	–	25	20
H247	–	–	–	–	18	–	–	19
H248	–	–	–	17	–	–	22	19
H249	–	–	16	20	20	19	24	24
H250	21	18	21	20	16	20	20	20
H254	–	–	–	17	17	19	20	24
H255	46	36	32	–	14	–	–	18
H256	44	36	34	–	–	–	–	18
H258	42	34	34	–	–	–	–	18
H259	–	–	14	19	21	24	23	25
H260	36	–	33	18	23	22	21	22



**Table 2** (continued)

Strain	Activity <sup>a</sup> (mm) against:							
	<i>Staphylococcus aureus</i> S1	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 639c	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> M3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	<i>Penicillium expansum</i> PE1	<i>Umbelopsis ramanniana</i> NRRL 1829	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333
H261	34	37	31	17	22	19	18	19
H262	34	37	31	17	22	18	18	21

<sup>a</sup> Activity was estimated by measuring the diameter of the clear zone of growth inhibition. -, No activity. Strains H145, H147, H150, H151, H155, H195, H196, H198, H 201, H203, H213, H215, H216, H217, H218, H221, H223, H229, H231, H232, H234 and H238 are inactive against all indicator microorganisms tested

and *S. halophila* and *S. paurometabolica* (99.6 %). The possibility of new species of *Saccharomonospora* being present in Algerian arid soils cannot not ruled out. Strains H126, H227, H233 and H234 (closely related to *S. halophila* and *S. paurometabolica*) were isolated from highly saline soils of Zelfana (M'zab region). The other strains (closely related to *S. halophila* and *S. paurometabolica*, and also to *S. saliphila*) were isolated from moderately saline soils of the M'zab region.

Cluster II, representing the genus *Prauserella*, exhibits a physiological heterogeneity, suggesting the presence of three different species. Based on the phylogenetic study (Fig. 3), strains H149 and H206 were assigned to *Prauserella alba* and *P. aidingensis*, with a similarity of 99.8 and 100 %, respectively. Nevertheless, strains H225 and H137 showed only a 98.9 and 99.4 % similarity to *P. flava*. We noted that three members of this genus, *Prauserella salsuginis*, *P. flava* and *P. sediminis*, have been reported to be very close phylogenetically, with 99.7–99.9 % similarity (Li et al. 2009). These results suggest that our strains represent more than one novel species based on their phylogenetic and physiological heterogeneity. This is the first report of the isolation of *Prauserella* from Algerian arid ecosystems. All *Prauserella* strains were isolated from moderately saline soils of the M'zab region.

The strains of *Actinopolyspora* (cluster I) had lineages that were distinct from each other and from other members of this genus (Fig. 4). Eight of the isolated strains of this genus were most closely related to *Actinopolyspora saharensis* with a similarity of 99.4–99.9 %. Strain H202 was linked to *Actinopolyspora mzabensis* with a similarity of 99.4 %, however strain H259 showed a similarity of only 98.8 % with *A. laccussalsi* and four strains (H255, H258, H260 and H261) were most closely related to *A. erythraea* with a similarity of 99.1 %. Some of *Actinopolyspora* species showed a relatively high similarity percentage between each other (99.2 % between *A. dayingensis* and *A. mortivallis* and 99.3 % between *A. laccussalsi* and *A. righensis*) (Guan et al. 2013a, b; Meklat et al. 2013), suggesting the possible presence of two new species of this genus,

particularly for strains H259 on the one hand and H255, H258, H260 and H261 on the other hand. Strains H255, H258, H260 and H261 (closely related to *A. erythraea*), H254 (closely related to *A. saharensis*) and H259 (closely related to *A. laccussalsi*) were isolated from salty soils of the Zibans region. The other strains of *Actinopolyspora* (closely related

**Table 3** Distributions of the genes encoding modular polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthetases in strains not showing any antimicrobial activity on ISP2 solid medium

Strain	Presence of indicated gene			
	PKS-I	PKS-II	PKSE	NRPS
H145	+	+	+	+
H147	+	+	-	+
H150	-	+	+	+
H151	-	-	-	+
H155	-	-	-	+
H195	-	-	-	-
H196	-	-	-	-
H198	-	-	-	+
H201	-	+	-	+
H202	-	+	-	+
H203	-	+	-	+
H213	-	-	-	+
H215	-	-	+	+
H216	-	-	-	+
H217	-	-	-	+
H218	-	-	-	-
H223	-	-	-	+
H229	-	+	-	+
H231	-	+	-	+
H232	-	+	-	+
H234	-	+	-	+
H238	-	+	-	+

PKS-I, modular polyketide synthase; PKA-II, iterative PKA ; PKSE, enediyne polyketide synthase; NRPS, non-ribosomal peptide synthetases  
-, Gene not present; +, gene present

to *A. saharensis* and *A. mزابensis*) were isolated from moderately saline soils of the M'زاب region.

The results of the phylogenetic tree (Fig. 4) confirmed the membership of cluster III to the genus *Saccharopolyspora* and also showed that many strains in cluster III were closely related to *Saccharopolyspora halophila* with similarities ranging between 99.3 and 99.8 %. A single strain, H145, was related to a *Saccharopolyspora lacisalsi* with a similarity of 99.5 %. High 16S rRNA similarities have occasionally been found between closely related species of *Saccharopolyspora*, as in the case of *S. erythraea* and *S. spinosporotrichia* (99.7 %), *S. pathumthaniensis* and *S. endophytica* (99.3 %) and *S. dendranthema* and *S. endophytica* (99.2 %). Furthermore, the large physiological difference observed between our strains suggests that they belong to one or two novel species of *Saccharopolyspora*. All *Saccharopolyspora* strains were isolated from moderately saline soils of the M'زاب region.

The analysis of physiological cluster VII revealed four strains (H150, H151, H195, H199) with a shared similarity within the range of 91.4 and 92.2 %. These 16S rRNA sequence similarity values are very low. Indeed, the four strains of cluster VII represent a very distinct phylogenetic lineage of the neighbor genera *Actinopolyspora* and *Saccharopolyspora*, suggesting a high probability of the presence of new genus. The four strains were isolated from moderately saline soils of the M'زاب region.

In general, we found no correlation between the degree of soil salinity and the degree of resistance of actinobacterial strains to NaCl. For example, some strains of *Saccharomonospora* growing in the presence of 7–15 % NaCl were isolated from highly saline soils, while other strains of *Actinopolyspora* that grew in the presence of 7–30 % NaCl were isolated from moderately saline soils.

#### Antimicrobial activity

Forty-seven of the isolated strains showed activities against one or many of the target microorganisms: Gram-positive bacteria (such as *Bacillus subtilis* ATCC 6633, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 639c and *S. aureus* S1), filamentous fungi (such as *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829, *Penicillium expansum* PE1 and *Aspergillus carbonarius* M333) and yeasts (such as *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226 and *Candida albicans* M3). The diameter of the inhibition zones varied from 14 to 46 mm (Table 2). Halophilic actinobacteria proved to be an interesting source of bioactive molecules. Hamedi et al. (2013) reported the results of several studies on bioactive molecules secreted by halophilic and halotolerant actinobacterial strains (terrestrial and marine) belonging to the genera of *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, among others. Meklat et al. (2012) isolated, from Saharan soil, a new species of *Actinopolyspora* which shows strong

antibacterial (against Gram-positive and Gram-negative bacteria) and fungal activities (against filamentous fungi and yeast). Dhanasekaran (2014) reported the anti-infective potential of halophilic actinobacteria against drug-resistant human pathogenic microorganisms.

#### Detection of PKS-I, PKS-II, PKSE and NRPS genes in selected strains

The culture media used in this study may not have provided all of the physical conditions (such as temperature, pH, agitation, etc.) and chemical conditions (nutrients, minerals, etc.) needed to stimulate the production of bioactive secondary metabolites in some of the halophilic strains. Therefore, the potential of all 22 non-productive actinobacterial strains to produce bioactive compounds was evaluated by PCR for the detection of the genes encoding polyketide synthases (type I, II and PKSE) and NRPS using the primers listed in the **Materials and methods**. In general, high frequencies of positive PCR amplification were obtained for NRPS (87.5 %) and PKS-II (50 %), as shown in Table 3. In contrast, PKSE and PKS-I sequences were detected only in 16.6 and 8.3 % of the studied strains, respectively. The high frequency of NRPS genes in the studied actinobacterial strains may be evidence of the high potential of halophilic actinobacteria to produce a large number of bioactive secondary metabolites. Furthermore, the unusually high detection of NRPS genes may be explained in part by the efficiency of the primers A3F–A8R, which were developed to amplify the NRPS adenylation domains of the mannopeptimycin biosynthetic gene cluster, as reported by Magarvey et al. (2006) and Janso and Carter (2010). The low occurrence of PKS-I genes in actinobacterial strains has been reported by Qin et al. (2009).

In conclusion, we have identified isolates from six known halophilic genera (*Actinopolyspora*, *Prauserella*, *Streptomonospora*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora* and *Saccharomonospora*). Some of the isolates are likely to be new species within these genera. More interestingly, an unknown genus was also isolated. The results obtained support the notion that halophilic actinobacteria isolated from arid environments have a high potential to produce a large number of biologically active compounds.

#### References

- Al-Tai AM, Ruan JS (1994) *Nocardiopsis halophila* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil. *Int J Syst Bacteriol* 44:474–478
- Anderson AS, Clark D, Gibbons P, Sigmund JM (2002) The detection of diverse aminoglycoside phosphotransferases within natural populations of actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29:60–69
- Ayuso-Sacido A, Genilloud O (2004) New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and

- distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb Ecol* 49:10–24
- Becker B, Lechevalier MP, Gordon RE, Lechevalier HA (1964) Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol* 12:42–43
- Boudjelal F, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N (2011) Taxonomy and antimicrobial activities of two novel halophilic *Saccharomonospora* strains isolated in Algerian Sahara soils. *Ann Microbiol* 61:299–305
- Cai M, Tang SK, Chen YG, Li Y, Zhang YQ, Li XJ (2009) *Streptomonospora amylolytica* sp. nov. and *Streptomonospora flavalba* sp. nov., two novel halophilic actinomycetes isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2471–2475
- Chang X, Liu W, Zhang XH (2012) *Salinactinospira qingdaonensis* gen. nov., sp. nov., halophilic actinomycete isolated from a salt pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:954–959
- Chun J, Bae KS, Moon EY, Jung SO, Lee HK, Kim SJ (2000) *Nocardiopsis kusanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1909–1913
- Coenye T, Falsen E, Vancanneyt M, Hoste B, Govan JR, Kersters K, Vandamme P (1999) Classification of *Alcaligenes faecalis*-like isolates from the environment and human clinical samples as *Ralstonia gilardii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:405–413
- Cui X-L (2012) Genus III. *Streptomonospora*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, the actinobacteria, 2nd edn, vol 5. New York Dordrecht Heidelberg, Springer SBM, pp 1908–1914
- Dhanasekaran P (2014) Anti-infective potential of halophilic actinomycetes isolated from saltpan. *Malaya J Biosci* 1:37–40
- González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, Genilloud O (2005) Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol Ecol* 54:401–415
- Guan TW, Zhao HP, Che ZM, Zhang XP, Zhang LL (2013a) *Actinopolyspora dayingensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a hypersaline lake. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:787–792
- Guan TW, Wei B, Zhang Y, Xia ZF, Che ZM, Chen XG, Zhang LL (2013b) *Actinopolyspora lacussalsi* sp. nov., a novel extremely halophilic actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3009–3013
- Hamed J, Mohammadipanah F, Pter G, Sprer C, Schumann P, Klenk HP (2011) *Nocardiopsis arvandica* sp. nov., isolated from sandy soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1189–1194
- Hamed J, Mohammadipanah F, Ventosa A (2013) Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles* 17:1–13
- Hozzein WN, Trujillo ME (2012) Genus I. *Nocardiopsis*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, the actinobacteria, 2nd edn, vol 5. New York Dordrecht Heidelberg, Springer SBM, pp 1891–1906
- Hsu SC, Lockwood JL (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl Microbiol* 29:422–426
- Janso JE, Carter GT (2010) Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Appl Environ Microbiol* 76:4377–4386
- Jiang C, Xu L (1993) Actinomycete diversity in unusual habitats. *Actinomycetes* 4:47–57
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) Mammalian protein metabolism. Academic, New York, pp 21–132
- Kim SB (2012) Genus XIII. *Saccharomonospora*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, the actinobacteria, 2nd edn, vol 5. New York Dordrecht Heidelberg, Springer SBM, pp 1390–1396
- Kim SB, Goodfellow M (2012a) Genus XII. *Prauserella*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, the actinobacteria, 2nd edn, vol 5. New York Dordrecht Heidelberg, Springer SBM, pp 1384–1390
- Kim SB, Goodfellow M (2012b) Genus XIV. *Saccharopolyspora*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, the actinobacteria, 2nd edn, vol 5. New York Dordrecht Heidelberg, Springer SBM, pp 1396–1414
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:716–721
- Lechevalier MP, Lechevalier HA (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* 20:435–443
- Li WJ, Kroppenstedt RM, Wang D, Tang SK, Lee JC, Park DJ, Kim CJ, Xu LH, Jiang CL (2006) Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1089–1096
- Li Y, Tang SK, Chen YG, Wu JY, Zhi XY, Zhang YQ, Li WJ (2009) *Prauserella salsuginis* sp. nov., *Prauserella flava* sp. nov., *Prauserella aidingensis* sp. nov. and *Prauserella sediminis* sp. nov., isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2923–2928
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J (2000) Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 38:471
- Liu W, Ahlert J, Gao Q, Wendt-Pienkowski E, Shen B, Thorson JS (2003) Rapid PCR amplification of minimal enediyne polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11959–11963
- Locci R (1989) Streptomycetes and related genera. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp 2451–2493
- Magarvey NA, Haltli B, He M, Greenstein M, Hucul JA (2006) Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drugs-resistant Gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2167–2177
- Meklat A, Sabaou N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A (2011) Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol* 77:6710–6714
- Meklat A, Sabaou N, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Spröer C, Klenk HP (2012) A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil. *Ann Microbiol* 62:1049–1057
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013) *Actinopolyspora righensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104:301–307
- Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2014) *Saccharopolyspora ghardaiensis* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *J Antibiot* 67:299–303
- Metsä-Ketelä M, Salo V, Halo L, Hautala A, Hakala J, Mäntsälä P, Ylihönö K (1999) An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 180:1–6
- Nolan RD, Cross T (1988) Isolation and screening of actinomycetes. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds) Actinomycetes in biotechnology. Academic, San Diego, pp 1–32

- Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, Xu LH, Li WJ (2009) Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol* 75:6176–6186
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Schippers A, Bosecker K, Willscher S, Spröer C, Schumann P, Kroppenstedt RM (2002) *Nocardiopsis metallica* sp. nov., a metal leaching actinomycete isolated from an alkaline slag dump. *Int J Syst Bacteriol* 52:2291–2295
- Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA (2003) Non ribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* 20:275–287
- Selyanin VV, Oborotov GE, Zenova GM, Zvyagintsev DG (2005) Alkaliphilic soil actinomycetes. *Microbiology* 74:838–844
- Shen B (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* 7:285–295
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16:313–340
- Solanki R, Khanna M, Lal R (2008) Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol* 48:410–431
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Tang SK, Zhi XY, Wang Y, Shi R, Lou K, Xu LH, Li WJ (2011) *Haloactinopolyspora alba* gen. nov., sp. nov., halophilic filamentous actinomycete isolated from a salt lake, with proposal of *Jiangellaceae* fam. nov. and *Jiangellineae* subord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:194–200
- Trujillo ME, Goodfellow M (2012) Genus I. *Actinopolyspora*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology, the actinobacteria*, 2nd edn, vol 5. New York Dordrecht Heidelberg, Springer SBM, pp 163–170
- Yang R, Zhang LP, Guo LG, Shi N, Lu Z, Zhang X (2008) *Nocardiopsis valliformis* sp. nov., an alkaliphilic actinomycete isolated from alkali lake soil in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1542–1546