

**INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE EL-HARRACH**  
Thèse De Doctorat d'État en Sciences Agronomiques  
Département Phytopathologie  
Microbiologie

***Étude taxonomique et des propriétés  
antagonistes des *Streptosporangium* des  
sols sahariens***

**caractérisation des principaux antibiotiques  
sécrétés par trois souches**

Par

**BOUDJELLA Hadjira**

Directeur de thèse M. Nasserline SABAOU

Soutenue le 02 / 12 / 2007

devant le jury composé de : M. M. BELLAL Professeur Président M. N. SABAOU Professeur Directeur  
de thèse M. A. LEBRIHI Professeur Examineur M. R. BAKOUR Professeur Examineur Mme  
LOUANCHI Maître de conférences Examineur



# Table des matières

AVANT-PROPOS . .	5
Liste des abréviations . .	7
Résumé . .	9
Abstract . .	11
ص-مخملها . .	12
INTRODUCTION GÉNÉRALE . .	13
RÉTROSPECTIVE SUR LES ACTINOMYCÈTES ET LEURS ANTIBIOTIQUES . .	16
I. TAXONOMIE DES ACTINOMYCÈTES EN GÉNÉRAL ET DES <i>STREPTOSPORANGIACEAE</i> EN PARTICULIER . .	16
1. Taxonomie des actinomycètes . .	16
2. Taxonomie des <i>Streptosporangiaceae</i> à sporanges . .	22
II. ECOLOGIE DES ACTINOMYCÈTES ET TECHNIQUES D'ISOLEMENT . .	28
1. Ecologie des actinomycètes . .	28
2. Techniques d'isolement . .	29
III. IMPORTANCE DES ACTINOMYCÈTES . .	33
1. Importance dans les domaines médical, vétérinaire et industriel . .	33
2. Importance dans le domaine agronomique . .	34
3. Autres rôles . .	35
IV. LES ANTIBIOTIQUES . .	35
1. Généralités . .	35
2. Production, purification et détermination des structures des antibiotiques . .	42
3. Données sur quelques groupes d'antibiotiques . .	45
MATÉRIEL ET MÉTHODES . .	61
I. ISOLEMENT SÉLECTIF DES <i>STREPTOSPORANGIACEAE</i> À SPORANGES . .	61
1. Origine et caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol . .	61
2. Méthodes d'isolement . .	62
3. Reconnaissance des isolats . .	63
4. Purification et conservation . .	63
II. DÉTERMINATION DES ISOLATS DE <i>STREPTOSPORANGIUM</i> . .	63
1. Etude morphologique . .	63
2. Etude chimique . .	64
3. Étude physiologique . .	65
4. Etude moléculaire . .	66
III. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTAGONISTES DES SOUCHES DE <i>STREPTOSPORANGIUM</i> . .	70
1. Microorganismes-cibles . .	70
2. Technique des stries croisées . .	70
IV. ÉTUDE APPROFONDIE DES ANTIBIOTIQUES DES TROIS SOUCHES DE <i>STREPTOSPORANGIUM</i> . .	70
1. Détermination du spectre d'action des trois souches de <i>Streptosporangium</i> sur milieu solide . .	70

2. Production des antibiotiques par les souches de <i>Streptosporangium</i> sur divers milieux liquides . . .	71
3. Cinétique de production d'antibiotiques en milieu ISP2 . . .	72
4. Purification des antibiotiques . . .	73
5. Étude physico-chimique et spectroscopique des antibiotiques . . .	76
III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS . . .	77
CHAPITRE I. ISOLEMENT SÉLECTIF DES STREPTOSPORANGIACEAE À SPORANGES ET PROPRIÉTÉS ANTAGONISTES DES ISOLATS DE STREPTOSPORANGIUM . . .	78
CHAPITRE 2 : ÉTUDE TAXONOMIQUE ET DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT D'ACTINOMYCÈTE SG3 . . .	87
CHAPITRE II. ÉTUDE TAXONOMIQUE ET DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT D'ACTINOMYCÈTE SG163 . . .	125
ÉTUDE TAXONOMIQUE ET DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT D'ACTINOMYCÈTE SG10 . . .	157
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION . . .	171
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES . . .	177
ANNEXES . . .	200
ANNEXE1 : SITES DE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SOL . . .	200
II. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS . . .	201
ANNEXE 2 : MILIEUX DE CULTURE D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES STREPTOSPORANGIACEAE . . .	201
I. MILIEUX D'ISOLEMENT DES STREPTOSPORANGIACEAE . . .	201
II. MILIEUX D'IDENTIFICATION DES STREPTOSPORANGIUM . . .	202
ANNEXE 3 : MILIEUX DE PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES . . .	205
1. Milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966) . . .	205
2. Milieu de Omura <i>et al.</i> (1989) . . .	205
3. Milieu de Gilpin <i>et al.</i> (1995) . . .	205
4. Milieu ISP4 (Shirling et Gottlieb, 1966) . . .	205
5. Milieu minéral . . .	205
ANNEXE 4 : RÉVÉLATEURS CHIMIQUES UTILISÉS POUR LES ANTIBIOTIQUES (Merck, 1975) . . .	206
1. Anisaldéhyde - acide sulfurique : révélateur des glucides, des stéroïdes, des terpènes et des phospholipides contenant de la glucosamine. . .	206
2. Naphtorésorcinol - acide sulfurique : révélateur des glucides. . .	206
3. Chlorure de fer ferrique (FeC1 <sub>3</sub> ) : révélateur des phénols et des acides hydroxamiques. . .	206
4. Formaldéhyde - acide sulfurique : révélateur des aromatiques polycycliques. . .	206
5. Ninhydrine : révélateur des amines, des acides aminés, des osamines et des phospholipides contenant la phosphatidyléthanolamine. . .	207
LISTE DES PUBLICATIONS . . .	207
LISTE DES COMMUNICATIONS . . .	208

---

## AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse de l'Ecole Normale Supérieure d'Alger (LPBVB-ENS-Kouba) et au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS/INPT/UPS), au sein de l'équipe "Bioprocédés et Systèmes microbiens" de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INPT).

Qu'il me soit permis d'exprimer à Monsieur le Professeur Nasseridine SABAOU, toute ma reconnaissance pour m'avoir dirigé dans ce travail, pour m'avoir initié à la recherche et pour ses précieux conseils, son aide et sa disponibilité. Ses qualités scientifiques sont pour nous, un exemple dans le domaine de la recherche. Qu'il accepte le témoignage de ma profonde gratitude.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à M. le Professeur Ahmed LEBRIHI, pour son accueil bienveillant dans son laboratoire (INPT-ENSAT de Toulouse) dans le cadre de la bourse FAD, pour l'intérêt qu'il a continuellement porté à ce sujet, pour ses précieux conseils et aide. Je le remercie également de me faire l'honneur de sa présence dans mon jury.

J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur le Professeur M.M. BELLAL qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.

J'adresse mes vifs remerciements aux Professeurs, Monsieur R. BAKOUR et Madame M. LOUANCHI qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements aux personnes qui ont contribué à la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse : Messieurs Y. COPPEL (CNRS de Toulouse) pour les spectres RMN et F. PONT (INSERM Hôpital Purpan) pour les spectres de masse; Mme BOUTABOUL (Université P. SABATIER de Toulouse) pour la spectroscopie infrarouge, Monsieur T. DOB (ENS Kouba) pour son aide précieuse lors des interprétations des spectres RMN et infrarouge, Monsieur L. MARCHAL (Faculté de médecine de Nancy) pour la microscopie électronique et les micrographies des isolats, et Monsieur le Professeur P. GERMAIN (ENSAIA-INPL de Nancy) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour des stages.

J'exprime également mes remerciements et ma reconnaissance à tous mes enseignants, du primaire à l'université, particulièrement mes enseignants de l'ENS de Kouba.

Mes remerciements vont également à Monsieur M. Aïssi de l'ENS de Kouba et également Madame F. Mathieu et Monsieur Tardy de l'ENSAT de Toulouse pour leur gentillesse, leur sympathie et leurs encouragements.

J'aimerais également exprimer mes vifs remerciements et amitiés à tous mes amis et collègues de laboratoire d'Alger et de Toulouse : Mounia, Sihem, Malika, Dalila, Rabiaa, Atika, Abdelghani, Nourredine, Lynda, Badji, Riba, Farida, Leila B., Sadjia, Zakia, Samia, Fella, Karima, Saliha, Hayet, Salima, Sihem, Leila S., Souâd, Hassiba, Assia, Wahiba, Gamal, Faouzi A., Faouzi K., Ali, Abdelouahed, Awanwee, Jeab, Hend, Phong, Jessica, Murielle, Gérard et Patricia, pour leur aide, leurs encouragements, leur soutien et la bonne ambiance de travail.

Je tiens à remercier vivement les familles Baha d'Alger et Djillali de Toulouse pour leur chaleureux accueil, leur affection et leur aide. Quelle que soit ma reconnaissance, elle reste bien faible en regard de ce que je leur dois.

Je remercie également tous les chercheurs du Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse, le Département des Sciences Naturelles, la Direction de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba et la Direction générale et la Direction de la Post-Graduation de l'INA.

Je voudrais exprimer mes remerciements à toute personne que j'ai oubliée de citer et qui aurait aidé ou contribué à la réalisation de cette thèse.

## Liste des abréviations

## Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens

Actino.	Actinomycètes	DSMZ	Deutsche Sammlung von
ACS	American Chemical Society		Mikroorganismen und Zellkulturen
AD	Adrar (échantillon de sol de)		GmbH
ADN	Acide désoxyribonucléique	E.A.E.	Ethanol – ammoniacal - eau
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
A.E.	Acétate d'éthyle	E.N.S.	Ecole Normale Supérieure
A.M.	Acétate d'éthyle – méthanol	FAB	Fast Atom Bombardment
AN.E.	Acétonitrile – eau	F.S.	Front du solvant
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction	G	Groupe morphologique
	Analysis	G+C	Guanine + Cytosine
ARN	Acide ribonucléique	gen	Gentamicine
ATCC	American Type Culture Collection	GS	Gassi-Touil (échantillon de sol de)
BA	Béni-Abbès (échantillon de sol de)	GYEA	Glucose-Yeast Extract-Agar (milieu de culture)
B.A.E.	<i>n</i> -butanol-acide acétique-eau		
BENZ.	Benzène	HEX.	<i>n</i> -hexane
BET	Bromure d'éthydiu	HG	Hoggar (échantillon de sol du)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond
BUT.	<i>n</i> -butanol		Connectivity
CAP	<i>Candida</i> Aspartyl Proteinase	HPLC	High Performance Liquid
CCM	Chromatographie sur couche mince		Chromatography
CD3OD	Méthanol deutérié	H-V	Humic acid-Vitamines B (milieu de culture)
C.E.	Conductivité électrique		
CHLO.	Chloroforme	IC	Ionisation chimique
CH-V	Chitine-Vitamines B (milieu de culture)	IFO	Institute for Fermentation, Osaka, Japan.
CIP	Collection de l'Institut Pasteur (France)	INRA	Institut National de Recherche Agricole
COSY	Correlation Spectroscopy	IR	Infrarouge
CP	Chromatographie sur papier	ISP	International <i>Streptomyces</i> Project (milieux de culture)
C-V	Charbon-Vitamines B (milieu de culture)		
cycl	Cyclosérine	kan	Kanamycine
d	Doublet	LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
D.	Dépôt		
D.A.P.	Diaminopimelic acid	MA	Mycélium aérien
DMSO	Diméthylsulfoxyde	MeOH	Méthanol
DNP	Dictionary of Natural Products	<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate	MS	Mycélium du substrat
DO	Densité optique	<i>Mr.</i>	<i>Mucor</i>
M'S	M'Sila (échantillon de sol de)	RFLP	Restriction Fragment Length
Nal.	Nalidixic acid		Polymorphisme
Nano ESI	Nano Electro Spray Ionisation	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ND	Non déterminé (test)	s	Singulet
NRRL	Northern Regional Research Center,	S.	Saccharomyces
8	USA.	<i>S. carn.</i>	<i>Streptosporangium carneum</i>
OYG	Oatmeal-Yeast extract-Glycerol (milieu de culture)	Sg.	<i>Streptosporangium</i>
		S.S.S.	<i>Solution saline standard</i>
P	Sol prétraité à la chaleur	stp	<i>Streptomycine</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>	T	<i>Sol non traité à la chaleur</i>
<i>Pb.</i>	<i>Planobispora</i>	TAE	Tris-Acétate – EDTA (tampon)



---

## Résumé

L'analyse de 30 échantillons de sols sahariens algériens par des techniques sélectives, a permis d'isoler 73 souches de *Streptosporangiaceae* à sporanges dont 31 appartiennent au genre *Streptosporangium*, 37 à *Planomonospora* et 5 au genre *Planobispora*. Sur la base d'une étude morphologique, les 31 isolats de *Streptosporangium* ont été classés dans six groupes morphologiques. Ils ont également fait l'objet d'une étude préliminaire de leurs propriétés antagonistes. Ces deux dernières études ont permis de sélectionner 3 isolats de *Streptosporangium* pour une étude détaillée de leur taxonomie et de leurs antibiotiques. Ces 3 isolats, désignés Sg3, Sg163 et Sg10 présentent une morphologie différente de celle des espèces de référence de ce genre et des activités antimicrobiennes intéressantes.

Les études morphologiques et chimiques ont permis de confirmer l'appartenance des isolats au genre *Streptosporangium*. La détermination des espèces fut basée sur des critères physiologiques et moléculaires. La comparaison de leurs caractéristiques physiologiques avec celles des espèces valides de *Streptosporangium* ne nous a pas permis de les identifier. L'analyse de la séquence 16S de l'ADNr de chacun des trois isolats indique des pourcentages de similarité variant entre 96,3 et 98,8 avec les espèces valides de *Streptosporangium*. Les analyses phylogénétiques indiquent clairement que chacun des trois isolats se distingue l'un de l'autre et des autres espèces de *Streptosporangium*, suggérant la présence de trois nouvelles espèces.

La production d'antibiotiques par les trois isolats est évaluée sur différents milieux de culture, en utilisant *Mucor ramannianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* et/ou *Bacillus subtilis* comme microorganismes cibles. Les résultats obtenus ont montré que les trois isolats produisent des activités antifongiques, antibactériennes ou encore antilevuriennes. Cette production est meilleure dans le milieu ISP2.

Chacun des 3 isolats sécrète entre 4 et 24 antibiotiques, qui se présentent sous forme de complexes d'antibiotiques chimiquement proches entre eux. Leur localisation par bioautographie révèle 4 zones actives pour chacun des isolats dont l'une est présente dans la phase aqueuse pour Sg3 et Sg163. Les fractions actives ont été ensuite purifiées sur plaques épaisses de gel de silice ou sur colonne de gel de Séphadex LH-20 et par HPLC (colonne C18). Des révélations chimiques et des études spectroscopiques (UV-visible, infrarouge, masse,  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  RMN) ont été réalisées pour les antibiotiques purs et semipurs. Les spectres UV-visible des molécules étudiées indiquent l'absence de polyènes. Les résultats de ces études indiquent également que nos 3 isolats produisent des antibiotiques appartenant à différents groupes, notamment ceux des angucyclinones, des aminosides et des aromatiques glycosylés. Ces molécules, de par leurs caractéristiques physico-chimiques et spectroscopiques, se distinguent nettement de celles décrites dans la littérature.

La caractérisation de huit antibiotiques rouges de l'isolat Sg3 montre qu'ils sont très proches entre eux et suggère leur appartenance à un même groupe. La structure de l'antibiotique majoritaire R2.2 a été déterminée. Il s'agit d'une angucyclinone, un groupe d'antibiotiques polykétides aromatiques proche des anthracyclines et des tétracyclines et caractérisé par une structure de 4 cycles aromatiques accolés d'une manière asymétrique. L'antibiotique R2.2 est différent de toutes les angucyclinones décrites dans les ouvrages des produits bioactifs et représente une nouvelle molécule.

Les résultats obtenus encouragent la poursuite des études, aussi bien sur l'isolement sélectif des actinomycètes des sols sahariens, que sur les activités biologiques de leurs métabolites secondaires.

---

## Abstract

The analysis of 30 Algerian Saharan soil samples by selective methods, allowed to isolate 73 strains of *Streptosporangiaceae* with sporanges, 31 of which belonged to the genus *Streptosporangium*, 37 to *Planomonospora* and 5 to *Planobispora*. On the basis of a morphological study, the 31 isolates of *Streptosporangium* were classified into six morphological groups. They were also the object of a preliminary study of their antagonistic properties. These last two studies allowed the selection of 3 isolates of *Streptosporangium* for a detailed study of their taxonomy and antibiotics. The 3 isolates designated Sg3, Sg163 and Sg10 presented morphology different from that of the reference species of *Streptosporangium* as well as interesting antimicrobial activities.

Morphological and chemical studies confirmed the assignment of isolates to the genus *Streptosporangium*. The determination of species was based on physiological and molecular criteria. The comparison of their physiological characteristics with those of the valid *Streptosporangium* species did not allow us to identify them. The analysis of the 16S rDNA sequence of each of the three isolates indicated similarity levels varying between 96.3 and 98.8% within *Streptosporangium* species. Phylogenetic analyses clearly indicated that each of the three isolates represent a distinct phyletic line, suggesting the presence of three new *Streptosporangium* species.

The production of antibiotics by the three isolates was evaluated on various culture media, by using *Mucor ramannianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* and/or *Bacillus subtilis* as target microorganisms. The results showed that the three isolates produce antifungal, antibacterial or antiyeast activities. The production of antibiotics was better in ISP2 medium.

Each of the 3 isolates produced between 4 and 24 antibiotics, most of them as complexes of antibiotics. Their detection by bioautography revealed 4 active areas for each of the isolates. One of these activities was present in the aqueous phase for Sg3 and Sg163 isolates. Active fractions were then purified on silica gel plates or on Sephadex LH-20 column, and by HPLC (C18 column). Chemical revelations and spectroscopic studies (UV-visible, infrared, mass, RMN) were realized for the pure and/or semipure antibiotics. The UV-visible spectra of all the produced molecules indicated the absence of polyenes. The results also showed that our 3 isolates produced antibiotics belonging to various groups, including angucyclinones, aminoglycosides and glycosylated aromatics. The physico-chemical and spectroscopic characteristics suggested that these molecules were different from those described in the literature.

The characterization of eight red antibiotics of isolate Sg3 showed that they were very closely related and suggested that they belonged to the same group. The structure of the major antibiotic R2.2 was determined. It is an angucyclinone, a group of aromatic polyketide antibiotics close to anthracyclines and tetracyclines and characterized by a structure of 4 aromatic rings condensed in an asymmetric way. The antibiotic R2.2 is different from known angucyclinones, and thus it is a novel molecule.

These obtained results encourage the pursuit of studies, as well on the selective isolation of the actinomycetes from Saharan soils, as on the biological activities of their secondary metabolites.

## ص-خل مل ا

تفاوتت هذه الدراسة لتطلق 30 نوعاً من الأثرية الفصائلية الصحراوية بمرضى، حول بالقرية جوية نادرة من مجموعها *Streptosporangium* اقترت على إنتاج مضادات حيوية كالماء، و تلك باستعمال طرق عزل انتقالية خاصة سميت بالمسول على 73 DNA، منها 31 DNA فهي الجنس *Streptosporangium* 37 الجنس *Plectonospore* و 3 إلى *Plectonospore* في عضمت الفزلات الخمسة و الثلاثة من الجنس *Streptosporangium* اقترت بمرضى بوليفونية أولية سميت باسمها في 4 مجموعيات بوليفونية بحيث فسر كل مجموعيات ثلاثية مثالية مثلاً و نقل نوعاً واحداً و تلك الدراسة أولية لعضتها الفصائية. سلقت الدراسات الأخرى من استنتاج 3 عزلات من الجنس *Streptosporangium* مستقلة بوليفونية من الأنواع المعروفة لها الجنس و مثلاً تلك بالقرية الصحراوية المضادات الحيوية فقد اقترنتها بصورة مستقلة من حيث لعضتها و من حيث إنشائها المضادات الحيوية.

بالنسبة لعضمت الفزلات 45 DNA، أظهرت دراسات بوليفونية و بوليفونية استأخذت أثناء الفزلات 45 DNA الجنس *Streptosporangium* و دراسات لعضمت البوليفونية و البوليفونية بمرضى لمدة الفزلات و غير من مقارنة هذه المضادات من الفزلات 45 DNA تختلف من الأنواع المعروفة إلى *Streptosporangium* كما أكتت نتائج تحليل القطعة البولية 16S للقرية المعض النووي الريني الرينوزومي لكل عزلة في نسبة الفصائية التي تشمل القواعد في هذه البولية الفزلات ما بين 96.3 و 99.3 ضمن الأنواع المعروفة الجنس *Streptosporangium* كما يتضح من نتائج التحليل الجينومي في 3 من الفزلات 45 DNA تختلف عن بعضها البعض و عن الأنواع الأخرى بما بين أنواع مختلف.

ثم تمت دراسة إنتاج المضادات الحيوية من قبل الفزلات 45 DNA في أوساط مختلفة باستعمال *Staphylococcus aureus* *Micrococcus luteus* *Bacillus subtilis* لمرضى مختلفة و سلقت النتائج أن الفزلات 45 DNA تقع بمرضى ذات نشاط مضاد الفطريات و البكتيريا و الخمائر و أن هذا الإنتاج يكون أفضل في الوسط الحامضي 10%.

فسر كل عزلة ما بين 4 و 24 مختلفاً بوليفونية مختلفة على شكل مضادات، في لعضتها بطرق الكشف الجيني (genotyping) و الكيميائي، و تمت تحليلها بواسطة الكروماتوغرافيا على رقائق الورق أو الكروماتوغرافيا على المسود و الكروماتوغرافيا المسلكة الكفا التحليلية (HPLC) ثم عضمت الفزلات الكفا الدراسات عليها لعضمت الأكتة فوق الفصائية و البولية. الأكتة تحت الحرارة طيف الكفا و الزمن التحليلي القوي الكربون 13 و الكربون. فتمت من خلال التحليل الطيفي بالأكتة فوق الفصائية و البولية أن مضادات المضادات الحيوية عالية من الدراسات خاصة الفزلات البوليفونية (polymer). كما ظهر نتائج الدراسات الطيفية الأخرى إلى أن الفزلات 45 DNA تلحق مضادات حيوية من مجموعيات مختلفة على الفطريات المثلية غير المتطرفة و الفطريات الأهدية و الفطريات الصحراوية و أن هذه الفزلات تختلف من حيث عضتها البوليفونية و كذاها من تلك المعروفة و البوليفونية.

بالإضافة إلى تمجد عضمت 3 مضادات حيوية الفزلات 45 DNA و غير أنها مثالية و شتري نفس المجموعة الكيميائية و ركزت الدراسة على الفصدة الجوي 16S حيث تم تحديد بنية الكيميائية و غير أنه يظهر المجموعة الفطريات

---

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis le siècle dernier, un grand progrès a été réalisé dans le domaine de la chimiothérapie anti-infectieuse, permettant ainsi de lutter de manière efficace, contre la plupart des agents infectieux. Cependant, face à l'évolution de nouvelles maladies infectieuses, et au nombre croissant des cas de résistance à certains antibiotiques et à la toxicité de certains d'entre eux, il était essentiel et urgent de rechercher de nouveaux antibiotiques (Strohl, 1997). Ceux-ci peuvent être obtenus par fermentation microbienne ou par modification chimique d'un produit microbien (hémisynthèse) ou encore par synthèse chimique totale (Donadio *et al.*, 2002).

Les microorganismes et les plantes constituent la principale source naturelle d'antibiotiques (Lazzarini *et al.*, 2000). Kim *et al.* (2000) rapportent que les antibiotiques naturels présentent des caractéristiques prometteuses permettant le contrôle des maladies infectieuses car ils sont facilement et rapidement biodégradables et faiblement toxiques. De plus, la diversité de leurs activités biologiques et de leurs structures chimiques fournit des modes d'action intéressants (Tanaka et Omura, 1993; Thiele-Bruhn, 2003). Outre leurs activités antimicrobiennes, les antibiotiques sont souvent doués d'autres activités biologiques telles que les activités antitumorale, hypocholestérolémique, inhibitrice d'enzymes, ou encore antiparasitaire, insecticide et herbicide, etc. (Demain, 1999). En agriculture par exemple, les métabolites d'origine microbienne pourraient résoudre les problèmes liés à l'utilisation d'antibiotiques synthétiques et des autres produits chimiques, à savoir, leur toxicité vis-à-vis des cellules végétales, leur faible biodégradabilité entraînant l'accumulation de résidus néfastes dans le sol et l'induction de résistance chez les souches phytopathogènes (Kim *et al.*, 2000).

Parmi les microorganismes, les actinomycètes sont les plus grands producteurs d'antibiotiques (Sanglier *et al.*, 1993; Takahashi et Omura, 2003). Le genre *Streptomyces* est le plus exploité pour ses nombreuses propriétés antagonistes et continue d'attirer l'intérêt de plusieurs laboratoires dans le monde. Il sécrète près de 80% des antibiotiques naturels commercialisés et utilisés en médecine (Miyadoh, 1993; Watve *et al.*, 2001). Strohl (1997) estime que sur 12 000 molécules provenant des microorganismes, 55% sont produites par les actinomycètes du genre *Streptomyces*. Cependant, avec l'apparition de plus en plus croissante de souches pathogènes résistantes, plusieurs de ces antibiotiques sont devenus aujourd'hui peu ou non efficaces (Demain, 2000). Plusieurs stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces (Stead, 1997). L'une d'elles vise des souches de genres rares d'actinomycètes (autres que le genre *Streptomyces*) et provenant d'écosystèmes extrêmes et particuliers (Donadio *et al.*, 2002; Gupte *et al.*, 2002). Pour s'adapter à ces environnements extrêmes (de température, de salinité, de pH, etc.), ces actinomycètes rares disposeraient d'un système enzymatique et d'un métabolisme particuliers leur permettant de produire des métabolites secondaires originaux dont les antibiotiques. En effet, cette fraction d'actinomycètes s'est révélée être une source potentielle d'antibiotiques (Lazzarini *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 2003; Gathogo *et al.*, 2004).

Les actinomycètes rares sont faiblement représentés dans les sols. Leur croissance sur les boîtes d'isolement est très lente et ne peuvent rivaliser avec les autres microorganismes

à croissance plus rapide. Leur isolement nécessite de ce fait, l'application de méthodes sélectives particulières. Ces méthodes sont développées sur la base de plusieurs approches. Les échantillons de sol sont pré-traités par des moyens physiques et/ou chimiques de manière à éliminer les formes microbiennes végétatives non résistantes. Les milieux de culture sont composés d'éléments nutritifs qui favorisent spécifiquement la croissance de ces genres et peuvent être additionnés d'agents chimiques germicides inhibant les microorganismes indésirables (Steele et Stowers, 1991). Ces stratégies ont permis la découverte de nombreux genres et espèces nouveaux et également plusieurs substances originales dont des antibiotiques.

Les sols sahariens d'Algérie représentent des écosystèmes particuliers. Dans notre laboratoire (Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger), leur exploration a montré leur richesse et leur biodiversité en actinomycètes, des plus fréquents comme *Streptomyces* (Sabaou *et al.*, 1992), aux plus rares tels que *Actinomadura*, *Catellatospora*, *Couchioplanes*, *Herbidospora*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc. (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998). Plusieurs de ces souches sont des espèces nouvelles et produisent de nouvelles molécules antimicrobiennes (Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004a,b et 2005; Badji *et al.*, 2005; 2006 et 2007).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés au genre *Streptosporangium* relativement rare dans le monde. Depuis sa découverte, avec l'espèce type *Streptosporangium roseum* (Couch, 1955), plusieurs espèces nouvelles ont été isolées du sol (Holt *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 2005). Ce genre a été également isolé des sols des environnements extrêmes comme ceux du Sahara algérien (Boudjella, 1994; Bouti, 1997; Sabaou *et al.*, 1998). Le choix de ce genre est basé d'une part, sur le fait qu'il est phylogénétiquement proche des *Streptomyces* (Kemmerling *et al.*, 1993; Embly et Stackebrandt, 1994; Ward-Rainey *et al.*, 1996) et d'autre part, pour ses capacités à produire plusieurs métabolites secondaires à intérêt industriel, dont des antibiotiques tels que le chloramphénicol (Tamura *et al.*, 1971), la platomycine (Takasawa *et al.*, 1975), la déshydrosinéfingine (Cooper *et al.*, 1990), et d'autres substances bioactives comme les inhibiteurs de l'endothéline convertase (Tsurumi *et al.*, 1994), les insecticides (Mishra *et al.*, 1987), etc. La diversité de la nature de ces molécules suggère que les voies métaboliques de ce genre sont également diversifiées (Platas *et al.*, 1999).

Dans le présent travail, nous nous sommes fixé comme objectifs, l'isolement par des méthodes sélectives des *Streptosporangiaceae* à sporanges à partir d'échantillons de sol prélevés dans différentes régions du Sahara algérien. Puis, le choix de trois isolats de *Streptosporangium* que nous avons étudié d'un point de vue taxonomique et de la production d'antibiotiques.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une présentation bibliographique détaillée sur les actinomycètes en général et sur le genre *Streptosporangium* en particulier. Nous avons présenté leur taxonomie et leur importance dans les différents domaines (industriel, écologique, agro-alimentaire, vétérinaire et médical) avec un intérêt particulier consacré à leur grande aptitude à produire des antibiotiques. En ce qui concerne cette dernière propriété, nous avons traité succinctement leur production, leur purification et leur caractérisation. A la fin de cette première partie, nous avons focalisé sur trois grands groupes d'antibiotiques; ceux des angucyclines, des aminoglycosides et des antifongiques.

La seconde partie a trait aux différents matériels et méthodes utilisés et la troisième partie, aux résultats obtenus et à leurs discussions. Cette dernière partie comprend

quatre chapitres. Le premier est en rapport avec l'isolement sélectif qui nous a permis de sélectionner trois isolats de *Streptosporangium*. Les trois autres chapitres concernent chacun, l'étude approfondie d'un isolat du point de vue taxonomique et des antibiotiques. Ces derniers sont étudiés du point de vue production dans différents milieux de culture, purification et caractérisation par des méthodes spectroscopiques afin de déterminer leur nature chimique. Les activités biologiques sont également déterminées.

# RÉTROSPECTIVE SUR LES ACTINOMYCÈTES ET LEURS ANTIBIOTIQUES

Les actinomycètes, organismes procaryotes, sont des bactéries à Gram positif qui tendent à former des filaments ramifiés lesquels peuvent être assez développés pour former un véritable mycélium. Le diamètre de ces filaments varie entre 0,5 et 2  $\mu\text{m}$  mais est généralement inférieur à 1  $\mu\text{m}$ . Ils sont définis par un taux élevé en guanine et cytosine (supérieur à 55%), ce qui les sépare des autres procaryotes ayant un taux inférieur en G +C (Holt *et al.*, 1994).

Ce groupe englobe des genres très diversifiés dans leur morphologie. On retrouve la forme cocci (*Micrococcus*), ou une alternance "bacille-cocci" (*Arthrobacter*) mais la majorité tendent à former des filaments ramifiés, fragmentés (*Nocardia*, *Rhodococcus*), ou non (*Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*...).

## I. TAXONOMIE DES ACTINOMYCÈTES EN GÉNÉRAL ET DES *STREPTOSPORANGIACEAE* EN PARTICULIER

### 1. Taxonomie des actinomycètes

---

La systématique des actinomycètes est basée sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Les critères morphologiques et chimiques permettent d'identifier les genres et les critères physiologiques et moléculaires, les espèces.

#### 1.1. Critères morphologiques

L'observation à l'œil nu et surtout au microscope optique des colonies poussant sur un milieu gélosé permet déjà d'avoir une idée sur les genres. Les critères morphologiques sont énoncés dans les "Bergey's Manual" de 1989 et 1994.

Parmi les caractères cultureux importants pour la différenciation des genres d'actinomycètes, nous citerons :

- La production d'un mycélium aérien (MA) (cas de nombreux genres) ou non (ex : *Rhodococcus*, *Micromonospora* et *Actinoplanes* ).

- La présence ou non d'un mycélium du substrat (MS). Tous les genres d'actinomycètes possèdent un MS sauf *Sporichthya* dont le MA est rattaché au substrat solide par des cellules "crampons" (Lechevalier *et al.*, 1968).



- La couleur du MA et du MS. La couleur exacte peut être définie à l'aide d'une charte de couleur.

- La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

Les critères micro-morphologiques importants sont :

- la fragmentation ou non du MS.

- la formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, par deux ou en chaînes) ; la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue).

- la présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores.

- la présence de spores mobiles (ex : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, nombreux autres genres...).

- la formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou de structures spéciales telles que les synnemata (*Actinosynnema*), les sclérotés, les faux sporanges (*Kibdellosporangium*), etc.

### 1.2. Critères chimiques : chimiotaxonomie

Si pour certains genres, les caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance, comme c'est le cas de *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, etc., la grande majorité par contre (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Nocardioopsis*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Nocardioides*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Saccharothrix*, *Kitasatosporia*, *Glycomyces*, etc.), nécessite une étude chimique de leurs constituants cellulaires.

La chimiotaxonomie est basée sur l'analyse des acides aminés pariétaux, des glucides des cellules entières et des lipides membranaires (Jones et Krieg, 1989). Les ménaquinones et les acides gras sont parfois également analysés pour certains groupes d'actinomycètes.

Becker *et al.* (1965), Yamaguchi (1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970b) divisèrent les actinomycètes en chimiotypes sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux et des sucres cellulaires.

#### 1.2.1. Composition pariétale en acides aminés

En plus de la N-acétylglucosamine, de l'acide N-acétyl muramique, de l'acide glutamique et de l'alanine (L et D), la paroi de la plupart des bactéries non mycéliennes possède de la lysine, ou surtout de l'acide diaminopimélique (D.A.P.). Chez les actinomycètes, le D.A.P. peut être sous forme d'isomères LL ou DL (méso) et ce, suivant les genres. Un autre acide aminé, la glycine, est variablement présent. Chez les actinomycètes ne formant pas de véritable mycélium, le D.A.P. est remplacé par de la lysine, de l'ornithine ou de l'acide diaminobutyrique (Becker *et al.*, 1965; Yamaguchi, 1965). Selon la composition en acides aminés, les actinomycètes sont classés dans les chimiotypes I à VIII (voir paragraphe 1.2.3.).

#### 1.2.2. Composition cellulaire en sucres

Les sucres ayant une importance taxonomique pour les actinomycètes sont les couples "arabinose-galactose", "arabinose-xylose", "rhamnose-galactose", ainsi que le madurose ou 3-O-méthyl-galactose (Lechevalier et Lechevalier, 1970b). Les sucres déterminent ainsi les chimiotypes A, B, C, D et E (voir paragraphe 1.2.3.). Les actinomycètes ne possédant pas de sucres taxonomiquement importants sont classés dans le chimiotype C.

### 1.2.3. Classification des actinomycètes en chimiotypes

Les actinomycètes ont été classés dans dix chimiotypes selon leur composition cellulaire en acides aminés (Becker *et al.*, 1965; Yamagushi, 1965) et en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970b). Chaque chimiotype regroupe un certain nombre de genres qui peuvent être différenciés sur la base de l'étude morphologique et aussi d'autres études chimiques (notamment les lipides).

Les chimiotypes sont les suivants :

- I C : LL D.A.P. + glycine, pas de sucre caractéristique (pas d'arabinose, xylose, rhamnose et madurose).
- Ex : *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Sporichthya*, etc.
- II D : DL DAP + glycine + arabinose + xylose. Ex : *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Glycomyces*, etc.
- III B : DL DAP + madurose. Ex : *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Actinomadura*, etc.
- III C : DL DAP, pas de sucre caractéristique. Ex : *Nocardioopsis*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, etc.
- III E : DL DAP + rhamnose + galactose. Ex : *Saccharothrix*, *Kutzneria*, *Actinosynnema*.
- IV A : DL DAP + arabinose + galactose. Ex : *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, etc.
- V : ornithine + lysine. Ex : *Actinomyces*
- VI : lysine + acide aspartique et galactose (variablement présents). Ex : *Oerskovia*, *Promicromonospora*.
- VII : acide diamino-butyrique + glycine (lysine présente ou absente). Ex : *Agromyces*, *Clavibacter*.
- VIII : ornithine. Ex : *Aureobacterium*, *Curtobacterium*.

Le chimiotype pariétal a permis de distinguer par exemple, entre les genres *Nocardia*, *Streptomyces*, *Actinomadura* et *Nocardioopsis*, ces genres présentant des caractères morphologiques assez proches (Williams et Wellington, 1981).

### 1.2.4. Composition en lipides

Les membres d'un même genre ont obligatoirement le même type de paroi, mais des genres différents peuvent aussi avoir le même chimiotype. D'autres critères chimiques sont ainsi essentiels pour la reconnaissance des genres, notamment la composition en lipides.

Les lipides taxonomiquement importants sont représentés par les phospholipides, les ménaquinones, les acides mycoliques et les acides gras.

### Les phospholipides

---

La composition des membranes plasmiques en phospholipides est un critère très important complétant les chimiotypes définis précédemment. Ainsi, Lechevalier *et al.* (1977) ont distingué 5 types notés de PI à PV caractérisés généralement par la présence d'un ou de deux phospholipides caractéristiques :

- Type PI : caractérisé par l'absence de phospholipides azotés tels que la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC).

Ex : *Actinomadura*, *Spirillospora*, *Nocardioides*, etc.

- Type PII : contenant de la PE.

Ex : *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Spirillospora*, *Kutzneria*, *Saccharothrix*, etc.

- Type PIII : caractérisé par la présence de PC.

Ex : *Nocardiosis*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, etc.

- Type PIV: présence de PE et aussi de phospholipides (plusieurs) à structure non encore déterminée mais contenant de la glucosamine.

Ex : *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, etc.

- Type PV : contenant de la glucosamine et du phosphatidylglycérol.

Ex : *Oerskovia*, *Promicromonospora*, *Cellulomonas*, etc.

### Les ménaquinones

Les ménaquinones sont des lipides membranaires ayant dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carbonée aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (Collins *et al.*, 1980; Minnikin *et al.*, 1984). La ménaquinone MK9 (H2), par exemple, a neuf unités isoprènes dont deux hydrogénées et est présente chez la majorité des *Streptosporangiaceae* (Stackebrandt *et al.*, 1994).

Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides.

### Les acides mycoliques et les acides gras

Les acides mycoliques sont des lipides pariétaux complexes et insaturés. Ils sont importants uniquement pour différencier les actinomycètes ayant le chimiotype IV A (Mordarska *et al.*, 1972). Ainsi, les genres *Nocardia* et *Rhodococcus* possèdent des acides mycoliques tandis que *Amycolatopsis* et *Pseudonocardia* n'en contiennent pas.

La composition cellulaire 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).

### 1.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique

En plus des caractères morphologiques, la détermination des espèces est basée aussi sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de

différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc).

Lorsque les tests physiologiques sont très nombreux, les résultats deviennent difficilement exploitables. La taxonomie numérique basée sur ces tests a ainsi été créée. C'est une méthode de classification développée à la fin des années 1950 et où l'utilisation du micro-ordinateur s'avère indispensable. Elle consiste à utiliser un grand nombre de caractères physiologiques et biochimiques, tous considérés d'égale importance, et permet de définir des pourcentages de similarité entre les organismes grâce à l'utilisation de coefficients (de Jaccard, de Sokal et Michener, etc.). Elle vise à classer les souches individuelles des bactéries dans des groupes homogènes (clusters).

La taxonomie numérique a également apporté plus de clarté dans la reconnaissance des espèces, auparavant très confuse. Goodfellow(1971) fut l'un des premiers chercheurs à avoir appliqué cette analyse aux actinomycètes. Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus sur le genre *Streptomyces*. En effet, le nombre d'espèces de ce genre, qui était de 463 (Pridham et Tresner, 1974) a été réduit à 142 (Williams *et al.*, 1989). Le genre *Rhodococcus* a été créé grâce à cette analyse (Goodfellow et Alderson, 1977).

De plus, les chercheurs ont noté une bonne corrélation entre les résultats obtenus lors de la taxonomie numérique et ceux relatifs à la chimiotaxonomie et aux analyses des acides nucléiques telle que l'hybridation ADN-ADN (Labeda, 1988; Goodfellow *et al.*, 1990; Grund et Kroppenstedt, 1990).

### 1.4. Critères moléculaires

Actuellement, les caractéristiques morphologiques, physiologiques et chimiques sont considérées comme insuffisantes pour l'identification précise des espèces. L'introduction d'outils moléculaires a manifestement amélioré les techniques d'identification. Fiables et rapides, ces techniques sont applicables à tout organisme dont l'ADN, l'ARN ou leurs produits (les protéines) peuvent être isolés. Elles ont ainsi permis de tracer la phylogénie des actinomycètes (Stackebrandt et Woese, 1981; Stackebrandt *et al.*, 1981a et 1983; Stackebrandt, 1986), de regrouper ou de séparer des espèces entre elles (Fisher *et al.*, 1983; Poschner *et al.*, 1985; Miyadoh *et al.*, 1990; Ochi *et al.*, 1993) ou de fusionner des genres entre eux (Stackebrandt et Kroppenstedt, 1987).

Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, nous citerons l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine, ainsi que l'analyse des séquences des protéines ribosomiques.

#### 1.4.1. Analyse des séquences de l'ADN ribosomique 16S

L'analyse des séquences de l'ADN ribosomique 16S est aujourd'hui largement utilisée pour établir les relations phylogénétiques entre les groupes bactériens et déterminer les positions taxonomiques de nombreux organismes. C'est également une méthode rapide et efficace pour l'identification des espèces (Rainey *et al.*, 1996; Stackebrandt *et al.*, 1997).

Dans cette analyse, la partie de l'ADN génomique (ADNr), codant pour l'ARN ribosomique, en particulier 16S (d'une taille de l'ordre de 1600 paires de bases) d'un

organisme, est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction). Les séquences obtenues sont alors déterminées (séquençage) puis comparées avec des milliers de séquences d'espèces types disponibles dans des bases de données génomiques.

Stackebrandt *et al.* (1981a et 1983) sont les premiers à avoir utilisé ces techniques pour la taxonomie des actinomycètes. 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 de 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), du "Neighbor-Joining" (Saitou et Nei, 1987), ainsi que les méthodes de validation statistique des liens phylogénétiques (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 de l'ADNr 16S concernant plus de 90% des genres décrits.

Sur la base de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, Stackebrandt *et al.* (1997) proposèrent une nouvelle structure de classification hiérarchique pour les micro-organismes dans laquelle, les taxons proches phylogénétiquement au niveau générique sont groupés dans des familles, des sous-ordres, des ordres, des sous-classes et une classe, sans tenir compte des caractéristiques phénotypiques. La classe des *Actinobacteria* (regroupant des actinomycètes mycéliens et non mycéliens) fut ainsi créée.

L'adhésion d'une nouvelle souche à la classe des *Actinobacteria* est indiquée par des valeurs de similitude des séquences d'ADNr 16S supérieures à 80% (Stackebrandt *et al.*, 1997). Deux espèces sont considérées différentes lorsque le pourcentage de similitude est inférieur à 97% (Devereux *et al.*, 1990). Cependant, des espèces ayant des pourcentages de similitude entre 97 et 100% peuvent être différentes.

### 1.4.2. Pourcentage en guanine – cytosine

Le pourcentage en guanine-cytosine (G+C) de l'ADN bactérien est important lors de la description de l'espèce type d'un nouveau genre ainsi que la reconnaissance des genres et des familles d'actinomycètes. Chez les bactéries, le pourcentage de G+C varie entre 25 et 75%, et la valeur est constante pour un organisme donné (Johnson, 1989).

Les actinomycètes sont définis par un taux élevé en G+C, supérieur à 55% (Goodfellow et Cross, 1984). Ce taux a permis de différencier la lignée des actinomycètes de celle des *Bacillaceae*, des *Lactobacillaceae* et d'autres bactéries à Gram positif (G+C inférieur à 55%). Des bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus*, sont considérés comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinomycètes (Stackebrandt *et al.*, 1981b; Goodfellow, 1985 et 1989).

### 1.4.3. Hybridation ADN-ADN

Les études des réassociations ADN-ADN sont également utilisées dans la classification des actinomycètes pour déterminer les espèces (Mordarski *et al.*, 1981). En utilisant les ADN des souches de référence, le taux de réassociation ADN-ADN permet de décider si la souche analysée représente une nouvelle espèce ou non. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ré-association de leurs brins d'ADN inférieur à 70% (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt et Goebel, 1994).

### 1.4.4. Autres techniques moléculaires

D'autres techniques moléculaires sont utilisées, mais assez rarement dans la taxonomie des actinomycètes. Ainsi, la détermination des relations inter- et intra-spécifiques a été rendue facile par des méthodes rapides de typage de l'ADN, considérées en majorité comme des variantes de la technique PCR (Vanechoutte, 1996; Rademaker *et al.*, 2000; Gürtler et Mayall, 2001), comme celles visant le génome entier (RFLP) ou des gènes individuels (ARDRA) ou encore des groupes de gènes ("ribotyping"). Ainsi, l'ARDRA a été utilisée pour différencier les espèces d'*Actinomadura*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* et *Tsukamurella* (Steingrube *et al.*, 1997; Laurent *et al.*, 1999; Harvey *et al.*, 2001; Cook et Meyers, 2003).

Les protéines ribosomiques analysées par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide fournissent un bon outil de classification. Leur analyse chez *Streptomyces griseolavendus* a montré que cette espèce est un variant de *S. lavendulae* (Ochi *et al.*, 1993).

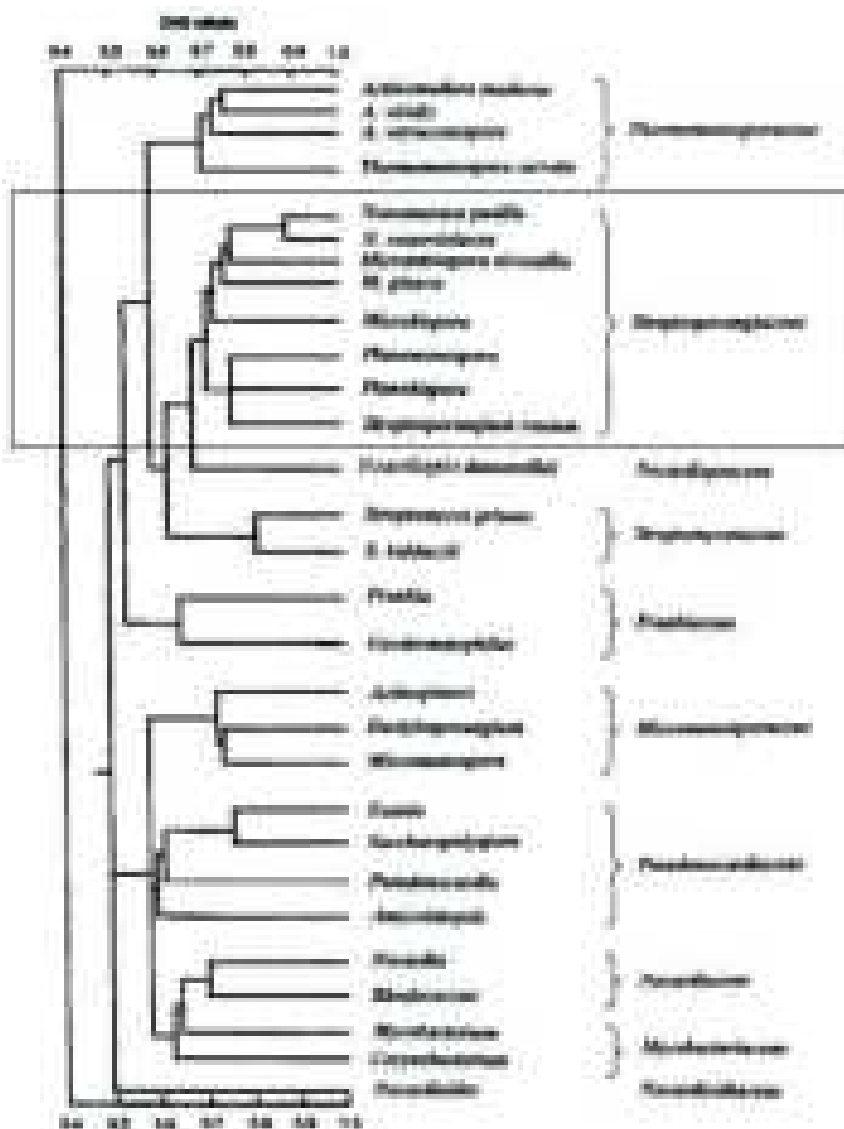
## 2. Taxonomie des *Streptosporangiaceae* à sporanges

---

### 2.1. Historique

En se basant sur les critères chimiques et morphologiques, Goodfellow (1989) a délimité 9 groupes dont celui des maduromycètes. Ce dernier, créé par Goodfellow et Cross dès 1983, comprend les actinomycètes ayant comme sucre cellulaire caractéristique, le madurose (3-0-méthyl-D-galactose) et fut scindé en deux sous-groupes. Le premier est constitué par les genres à sporanges (*Planomonospora*, *Planobispora*, et *Streptosporangium*) et le second, par les actinomycètes sans sporanges mais produisant de courtes chaînes de spores (*Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea* et *Herbidospira*).

La famille des *Streptosporangiaceae* a été créée par Goodfellow *et al.* (1990) sur la base d'une analyse des séquences de l'ADNr 16S (Figure 1). Elle est représentée par le genre type *Streptosporangium* (Couch, 1955) et est caractérisée par la présence dans les cellules du DL-DAP, du madurose, des phospholipides de type PIV et par l'absence d'acides mycoliques. Cette famille inclut les microorganismes aérobies, à Gram positif, formant un mycélium de substrat non fragmenté. Le mycélium aérien peut produire deux (*Microbispora*), quatre (*Microtetraspora*) ou plusieurs spores (*Nonomuraea*) ou encore des sporanges contenant une (*Planomonospora*), deux (*Planobispora*), quatre (*Planotetraspora*) ou plusieurs spores (*Streptosporangium*). La famille des *Streptosporangiaceae* est proche phylogénétiquement des *Streptomycetaceae*, des *Nocardiopsaceae* et des *Thermomsporaceae* (Goodfellow *et al.*, 1990 ; Stackebrandt *et al.*, 1997).



Grâce à l'analyse de l'ADNr 16S, Stackebrandt *et al.* (1997) ont classé cette famille dans le sous-ordre des *Streptosporangineae*, l'ordre des *Actinomycetales* et la classe des *Actinobacteria*.

Dans ce travail, nous nous limiterons à l'étude des *Streptosporangiaceae* à sporanges englobant les genres *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora*, et *Planotetraspora*.

## 2.2. Différenciation des genres de *Streptosporangiaceae* à sporanges par les critères morphologiques, chimiques et moléculaires

Les genres *Planomonospora*, *Planobispora*, *Planotetraspora* et *Streptosporangium* se distinguent facilement par leur micromorphologie (figure 2). Tous produisent un mycélium du substrat stérile et non fragmenté. Leurs cellules contiennent du DL DAP et du madurose (chimiotype III B), des phospholipides du type P IV et des ménaquinones majeures de type MK-9(H<sub>2</sub>), et/ou MK-9(H<sub>4</sub>).

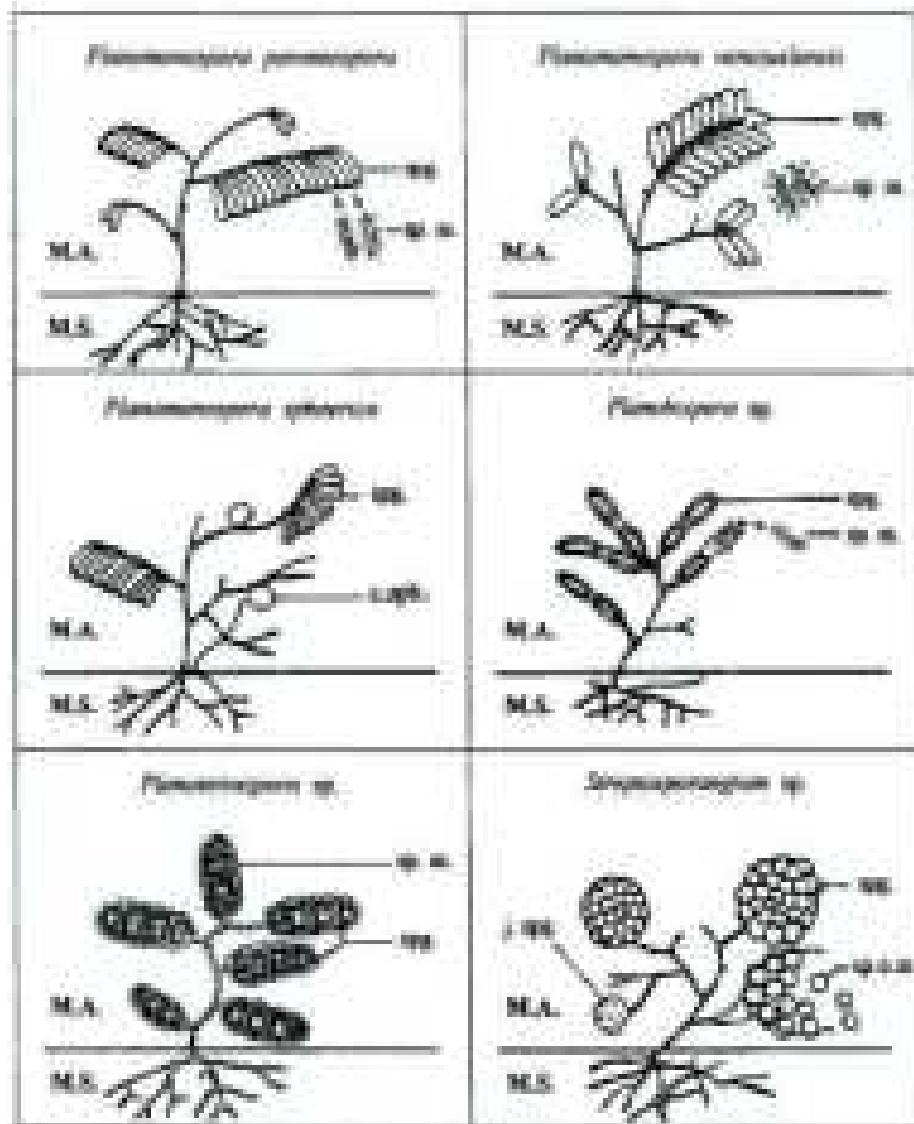
Le genre *Streptosporangium* fut décrit pour la première fois par Couch (1955), avec comme espèce-type, *Sg roseum*. Il est caractérisé par un mycélium aérien (MA) produisant des sporanges globuleux (5 à 20 µm de diamètre), sessiles ou portés par de courts sporangiophores (10 µm ou moins) et contenant chacun une seule chaîne spiralée de spores non mobiles, rondes à ovoïdes (1 à 2 µm de diamètre) ou plus rarement en bâtonnets droits (1 □ 2 µm). La paroi des sporanges est fine, de sorte que les spores sont visibles au microscope optique, avant même leur libération. Le pourcentage en bases G+C varie entre 69 et 71% (Stackebrandt *et al.*, 1994).

Le genre *Planomonospora* est caractérisé par la production sur le MA, de sporanges cylindriques (1–1,5 µm de diamètre et 3,5–5,5 µm de longueur) contenant chacun une seule spore en bâtonnet, droite ou légèrement incurvée, et mobile grâce à des flagelles péritriches (Thiemann *et al.*, 1967). Le pourcentage en bases G+C est de 72% (Goodfellow, 1989).

Le genre *Planobispora* se caractérise par la formation, sur le M.A., de sporanges cylindriques de 1 à 1,2 µm de diamètre et 6 à 8 µm de longueur, contenant chacun deux spores mobiles (Thiemann et Beretta, 1968). Le pourcentage en bases G+C varie entre 70 et 71% (Goodfellow, 1989).

Le genre *Planotetraspora* se distingue par des sporanges cylindriques portés par de courts sporangiophores et contenant chacun quatre spores mobiles disposées en une rangée droite. Le pourcentage en bases G+C varie entre 69 et 71% (Hu *et al.*, 1993)..



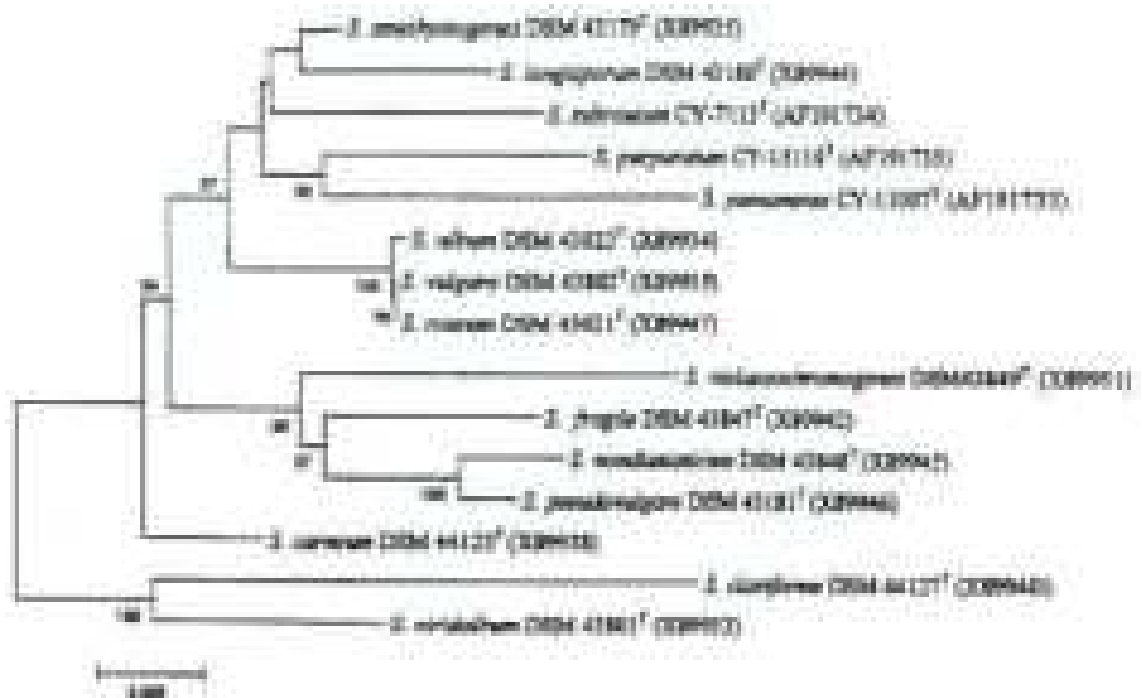


**Figure 2.** Micromorphologie des Streptosporangiaceae à sporanges appartenant aux genres *Planomonospora* (Thiemann et al., 1967), *Planobispora* (Thiemann et Beretta, 1968), *Planotetraspora* (Hu et al., 1993) et *Streptosporangium* (Nonomura, 1989).

M.A. : mycélium aérien ; M.S. : mycélium du substrat ; spg. : sporanges ; j. spg. : jeune sporange ; sp. m. : spores mobiles ; sp.n.m. : spores non mobiles ; c.sph. : corps sphérique.

### 2.3. Espèces du genre *Streptosporangium*

Actuellement, 15 espèces sont décrites (tableau 1). La figure 3 représente les relations phylogénétiques entre les différentes espèces de *Streptosporangium*, basées sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S.



**Figure 3.** Dendrogramme montrant les relations phylogéniques entre les différentes espèces de *Streptosporangium*, établi sur la base de l'analyse des séquences d'ADNr 16S, construit à partir des distances d'évolution par la méthode du "neighbor-joining" (Zhang et al., 2005).

La barre indique 0,005 substitutions par position de nucléotide.

#### 2.4. Espèces du genre *Planomonospora*

Le genre *Planomonospora* comprend actuellement 4 espèces: *Pm. parantospora* (Thiemann et al., 1967), *Pm. venezuelensis* (Thiemann, 1970), *Pm. sphaerica* et *Pm. alba* (Mertz, 1994). Ces 4 espèces sont différenciées entre elles par la couleur des mycéliums aériens et du substrat ainsi que celle des pigments solubles, par la disposition des sporanges (dirigés vers un même côté et simulant un "peigne" ou arrangés de manière opposée comme les folioles de palmier dattier), la présence ou non de corps sphériques (vésicules ne contenant aucune spore mais capable de germer) et quelques caractères physiologiques.

Tableau 1. Liste des espèces de *Streptosporangium*.

## RÉTROSPECTIVE SUR LES ACTINOMYCÈTES ET LEURS ANTIBIOTIQUES

Espèces	Numéros d'accès dans les collections mondiales de microorganismes	Références
<i>Sg. album</i>	DSM 43023 = IFO (= NBRC) 13900 = JCM 3025 = NRRL B-2635 = VKM Ac-636.	Nonomura et Ohara, 1960.
<i>Sg. amethystogenes</i>	ATCC 33327 = DSM 43179 = IFO (= NBRC) 13986 = JCM 3026 = KCC A-0026 = NRRL B-2639 = VKM Ac-637.	Nonomura et Ohara, 1960.
<i>Sg. carneum</i>	A84575 = IFO (= NBRC) 15562 = JCM 9926 = NRRL 18437 = VKM Ac-2007.	Mertz et Yao, 1990.
<i>Sg. claviforme</i>	D1 = DSM 44127 = IFO (= NBRC) 15623 = IPV 2852 = JCM 9313 = NCB 1160.	Petrolini <i>et al.</i> , 1992.
<i>Sg. fragile</i>	SK&F-BC2496 = ATCC 31519 = DSM 43847 = IFO (= NBRC) 14311 = JCM 6242 = NRRL B-16437 = VKM Ac-1296.	Shearer <i>et al.</i> , 1983.
<i>Sg. longisporum</i>	ATCC 25212 = DSM 43180 = IFO (= NBRC) 13141 = JCM 3106 = NRRL B-16783 = VKM Ac-696.	Schäfer, 1969.
<i>Sg. nondiastaticum</i>	ATCC 27101 = DSM 43848 = IFO (= NBRC) 13990 = JCM 3114 = VKM Ac-1299.	Nonomura et Ohara, 1969b.
<i>Sg. pseudovulgare</i>	ATCC 27100 = DSM 43181 = IFO (= NBRC) 13991 = JCM 3115.	Nonomura et Ohara, 1969b.
<i>Sg. purpuratum</i>	CCRC 16308 = DSM 44688 = CCTCC AA 97010 = CY-15110.	Zhang <i>et al.</i> , 2005.
<i>Sg. roseum</i>	ATCC 12428 = DSM 43021 = IFO (= NBRC) 3776 = JCM 3005 = NRRL 2505 = VKM Ac-807.	Couch, 1955.
<i>Sg. subroseum</i>	CY-7113 = CCTCC 97008 = CCRC 16302 = DSM 44662 = JCM 11962.	Zhang <i>et al.</i> , 2002.
<i>Sg. violaceochromogenes</i>	ATCC 21807 = DSM 43849 = IFO (= NBRC) 15560 = JCM 3281 = NRRL B-16784.	Kawamoto <i>et al.</i> , 1975.
<i>Sg. viridialbum</i>	ATCC 33328 = DSM 43801 = IFO (= NBRC) 13987 = JCM 3027 = KCC A-027 = NRRL B-2636 = VKM Ac-679.	Nonomura et Ohara, 1960.
<i>Sg. vulgare</i>	ATCC 33329 = DSM 43802 = IFO (= NBRC) 13985 = JCM 3028 = KCC A-0028 = NRRL B-2633 = VKM Ac-641.	Nonomura et Ohara, 1960.
<i>Sg. yunnaense</i>	CCRC 16307 = DSM 44663 = CCTCC AA 97009 = CY-11007.	Zhang <i>et al.</i> , 2005.

### 2.5. Espèces du genre *Planobispora*

*Planobispora* est l'un des genres d'actinomycètes les plus rares. Il a été découvert et décrit pour la première fois par Thiemann et Beretta (1968), avec comme espèce-type *Pb. longispora*. Il comprend deux espèces uniquement: *Pb. longispora* et *Pb. rosea* différenciées entre elles principalement par la couleur des mycéliums et quelques caractères physiologiques. La première possède un M.S. hyalin à beige et un M.A. blanc et la seconde, un M.S. rose et un M.A. rose pâle (Holt *et al.*, 1994).

## 2.6. Espèces du genre *Planotetraspora*

Le genre *Planotetraspora* a été découvert et décrit pour la première fois par Hu *et al.* (1993), avec comme seules espèces, l'espèce-type *Pt. Mira* et *Pt. silvatica* (Tamura et Sakane, 2004).

# II. ECOLOGIE DES ACTINOMYCÈTES ET TECHNIQUES D'ISOLEMENT

## 1. Ecologie des actinomycètes

---

D'après Waksman (1961), Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un actinomycète en 1875, et en 1878, Harz, nomma *Actinomyces bovis*, un organisme parasite trouvé dans une infection de la mâchoire d'un bovin. Depuis, les actinomycètes ont été isolés des sols, des matières organiques en décomposition, des eaux et, en général, de presque tous les habitats où la vie est possible.

Ils ont été isolés à partir de substrats et d'environnements naturels très diversifiés, comme les sols (désertiques, salés, des forêts et des champs), les glaciers et les sites thermaux, les cavernes, les sédiments, les eaux (lacs, rivières, ruisseaux, mers et océans) (Cross, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Ils sont présents dans l'air, le fumier, les composts, le foin, les débris végétaux, les litières, les graines de céréales, le pollen des plantes, etc. (Lacey, 1973; 1997). Mais c'est dans le sol qu'ils abondent le plus puisqu'ils y constituent environ 20% de la microflore totale (Ishizawa et Araragi, 1976).

Les actinomycètes sont en majorité saprophytes, mais quelques formes sont pathogènes pour l'homme, les plantes ou les animaux.

Les deux maladies humaines les plus sérieuses causées par des *Actinomycetales* sont la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis* et autres mycobactéries) et la lèpre (*Mycobacterium leprae*) (Mc Neil et Brown, 1994). Les secondes en importance, sont les actinomycoses humaines et animales causées par plusieurs espèces d'*Actinomyces* (*A. bovis*, *A. israelii*, etc.). De plus, les actinomycètes occasionnent certaines tumeurs (mycétomes) chez l'homme (*Actinomadura madurae*, *A. pelletieri*, *Nocardia asteroides*, *Streptomyces somaliensis*). La nocardiose est due surtout à *Nocardia asteroides*. Des actinomycètes thermophiles, surtout les *Faenia* et les *Thermoactinomyces*, sont responsables de pneumonies allergiques dont la plus connue est la maladie du poumon de fermier (farmers' lung disease) (Mc Neil et Brown, 1994). Parmi les infections animales, celles causées par *Dermatophilus congolensis* qui pousse dans la peau de nombreux animaux (exceptionnellement dans la peau de l'homme), causant une streptothricose capable de grands ravages chez les moutons dont il détruit la laine (Goodfellow et Williams, 1983; Zaria, 1993).

Peu de maladies des plantes sont provoquées par les actinomycètes. Notons la gale de la pomme de terre ("potato scab") causée par *Streptomyces scabies* (Mizuno et Yoshida, 1993). Les *Streptomyces* peuvent aussi s'attaquer à la betterave à sucre et à de jeunes plants de pommiers (Goodfellow et Williams, 1983). De plus, *Nocardia vaccinii* est la cause d'une gale des myrtilliers. Plusieurs actinomycètes peuvent profiter de blessures

des arbres pour s'introduire dans leurs vaisseaux et les boucher. Certaines espèces, dont *Streptomyces flavovirens*, peuvent dégrader la lignocellulose et jouer un rôle secondaire dans la carie des bois (Goodfellow et Williams, 1983).

Dans le sol, les actinomycètes sont retrouvés à partir de la surface jusqu'à plus de 2 m de profondeur, la zone la plus riche étant comprise entre 2 et 20 cm (Breton *et al.*, 1989). Ils sont plus nombreux que les champignons (en nombre de propagules par gramme de sol) mais moins abondants que les autres bactéries. Le genre *Streptomyces* représente souvent de 80 à 95% des *Actinomycetales* du sol et de divers autres substrats (Williams, 1978). Par ailleurs, les genres *Actinoplanes* et *Micromonospora* sont les plus répandus dans les milieux aquatiques (Goodfellow *et al.*, 1990).

Dans les sols sahariens algériens, les actinomycètes constituent entre 15 et 60% de la microflore totale et parfois même jusqu'à 85%. Ce pourcentage augmente jusqu'à 91% dans les horizons situés entre 1 et 2 m de profondeur avec une prédominance des *Streptomyces* et quelques fois des *Micromonospora*, des *Actinomadura* et des *Nocardioïdes* (Sabaou *et al.*, 1980; Sabaou *et al.*, 1992). Ces sols ont montré une grande diversité en genres d'actinomycètes, des plus abondants aux plus rares, voire même très rares dans le monde. C'est le cas des genres *Actinomadura*, *Nocardioïdes*, *Nocardioïpsis*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Oerskovia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*, etc. (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998).

Les *Streptosporangiaceae* à sporanges, représentés par les genres *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora* et *Planotetraspora*, sont présents en petits nombres dans divers types de sols, mais l'utilisation de méthodes sélectives permet de les isoler en nombres appréciables (Hayakawa *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 2001a,b; Lee et Hwang, 2002). Aucune espèce de ces genres n'est connue pour être pathogène.

## 2. Techniques d'isolement

---

Les méthodes utilisées pour l'énumération et l'isolement des actinomycètes et publiées avant 1965 n'ont concerné presque exclusivement que les espèces du genre *Streptomyces* et ont sous-estimé les représentants des autres genres. Ceci est dû au fait que les *Streptomyces* prédominent dans le sol, croissent relativement vite et sécrètent de nombreux antibiotiques, si bien que ce genre fut le plus étudié. Cependant, la découverte de nouveaux antibiotiques à partir des souches de genres rares, a encouragé l'élaboration de méthodes pour l'isolement des actinomycètes autres que *Streptomyces*.

Ces méthodes sont basées sur différentes approches, tels que le choix du milieu de culture favorable, le traitement physique et/ou chimique des suspensions de sol et l'incorporation de divers composés antibactériens et antifongiques au milieu d'isolement. Les résultats les plus remarquables sont ceux obtenus en combinant ces différentes méthodes d'isolement.

### 2.1. Choix des sources de microorganismes

De nombreux taxons originaux sécrétant de nouveaux antibiotiques sont isolés ces dernières années à partir de divers sols et habitats. Les laboratoires de recherche dans ce domaine reçoivent des échantillons de substrats du monde entier et analysent avec un intérêt particulier ceux provenant des milieux extrêmes dans l'espoir de découvrir de

nouvelles espèces ou souches intéressantes et également découvrir de nouvelles classes d'antibiotiques.

### 2.2. Choix du milieu de culture

L'utilisation de milieux de culture composés d'éléments nutritifs utilisés préférentiellement par des genres particuliers d'actinomycètes est l'une des approches considérées dans l'isolement sélectif.

Ainsi, des milieux composés de sources de carbone et d'azote difficilement assimilables par les microorganismes autres que les actinomycètes et additionnés de vitamines et de sels minéraux, ont été développés pour l'isolement sélectif des actinomycètes, notamment les milieux, "chitine-vitamines B" et "acides humiques-vitamines B" (Hayakawa et Nonomura, 1984; 1987) ainsi que le milieu " charbon-vitamines B" (You et Park, 1996).

### 2.3. Durée d'incubation

Lors de l'isolement, la durée d'incubation était habituellement de sept à dix jours, durée nécessaire pour la croissance des colonies des streptomycètes. Cependant, cette durée peut s'avérer insuffisante pour la croissance des autres actinomycètes à croissance plus lente. Pour leur détection, Nonomura et Ohara (1969a) sont les premiers à avoir isolé des souches rares d'actinomycètes grâce à des durées d'incubation allant parfois jusqu'à 40 jours.

### 2.4. Utilisation des antibiotiques et autres agents antibactériens

Une variété de substances antimicrobiennes ajoutées aux milieux, dont des colorants, des acides organiques et des antibiotiques, ont prouvé leur efficacité dans la réduction du nombre de microorganismes compétiteurs et ont révélé de nouvelles espèces et genres longtemps considérés comme rares ou absents. Les champignons compétitifs peuvent être éliminés par l'effet du cycloheximide seul ou combiné avec un polyène comme la nystatine ou la pimaricine.

L'addition d'agents antimicrobiens réduit légèrement ou même drastiquement le nombre d'actinomycètes, mais peut favoriser les souches les plus résistantes d'espèces et de genres normalement présents en petits nombres (tableau 2). Les espèces de *Thermoactinomyces* (Cross, 1968), de *Micromonospora* (Sveshnikova *et al.*, 1976), et d'*Actinoplanes* (Goodfellow *et al.*, 1990) se sont montrées particulièrement résistantes à la novobiocine et leurs souches peuvent être ainsi isolées facilement. L'addition de la tétracycline ou de ses dérivés au milieu de culture permet la sélection des souches de *Nocardia* (Orchard et Goodfellow, 1974). Mc Carthy et Cross (1981) isolèrent des souches de *Thermomonospora chromogena* en utilisant la kanamycine.

Tableau 2. Isolement sélectif des actinomycètes en utilisant les antibiotiques.

Genres isolés	Antibiotiques sélectifs	Références
<i>Actinomadura Actinoplanes</i>	Rubomycine Novobiocine	Lavrova <i>et al.</i> , 1972. Goodfellow <i>et al.</i> , 1990.
<i>Amycolatopsis</i>	Vancomycine	Lechevalier <i>et al.</i> , 1986.
<i>Streptosporangium</i>	Leucomycine Tobramycine	Hayakawa <i>et al.</i> , 1991b. Terekhova <i>et al.</i> , 1991.
<i>Dactylosporangium</i>	Tunicamycine	Hayakawa <i>et al.</i> , 1991b.
<i>Micromonospora</i>	Novobiocine Gentamicine Tunicamycine	Sveshnikova <i>et al.</i> , 1976. Ivanitskaya <i>et al.</i> , 1978. Wakisaka <i>et al.</i> , 1982.
<i>Thermomonospora</i>	Kanamycine	Mc Carthy et Cross, 1981.
<i>Thermoactinomyces</i>	Novobiocine (à 55°C)	Cross, 1968.
<i>Saccharothrix</i>	Benzylpénicilline + acide nalidixique	Labeda <i>et al.</i> , 1984.
<i>Streptoverticillium</i>	Oxytétracycline	Hanka <i>et al.</i> , 1985.
<i>Glycomyces</i>	Novobiocine	Labeda <i>et al.</i> , 1985b.

Note. "Streptoverticillium" est actuellement synonyme de Streptomyces (Holt *et al.*, 1994).

## 2.5. Pré-traitement des échantillons de sol

Le pré-traitement des sols est une des méthodes employées pour l'isolement sélectif des actinomycètes.

### 2.5.1. Pré-traitement à la chaleur sèche

Les spores aériennes de la majorité des actinomycètes résistent à la dessiccation et montrent une résistance plus élevée à la chaleur sèche que les hyphes végétatifs correspondants et que les bactéries non mycéliennes non sporulantes. Ce type de traitement a prouvé son efficacité dans l'isolement de nombreux genres rares. Le traitement des échantillons de sol à la chaleur sèche fut appliqué pour la première fois par Nonomura et Ohara (1969a). Par la suite plusieurs autres chercheurs traitèrent les échantillons de sol à 100 ou 120°C (chaleur sèche), pour isoler des souches de *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Dactylosporangium* (Hayakawa *et al.*, 1991a,b), *Sporichthya*, *Actinobispora* (Suzuki *et al.*, 1999; 2000) et *Actinomadura* (Zakharova *et al.*, 2003).

### 2.5.2. Pré-traitement aux pulsations électriques et aux radiations

Le traitement des sols avec des impulsions électriques s'est révélé efficace pour l'isolement sélectif des souches de *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Streptosporangium*, *Saccharothrix* et *Nocardioïdes* (Bulina *et al.*, 1998).

Bulina *et al.* (1997), puis Li *et al.* (2002) ont irradié des suspensions de sol avec des micro-ondes avant d'être diluées et étalées sur le milieu d'isolement. L'irradiation a augmenté la proportion des genres rares de 3 fois. Les actinomycètes isolés par cette méthode étaient représentés par les genres *Saccharothrix*, *Amycolatopsis*, *Nocardioïdes*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Promicromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium* et *Catellatospora*.

### 2.5.3. Pré-traitement aux agents chimiques germicides

Différents composés chimiques ont été utilisés en traitement des suspensions de sol dans le but d'empêcher la croissance des bactéries non mycéliennes sur les milieux d'isolement, parmi lesquels, le tellurite de potassium (Willoughby, 1971), le lauryl sulphate (You et Park, 1996), le phénol, le chlorure de benzéthonium, le benzoate, le gluconate de chlorheximide (Hayakawa *et al.*, 1991a,b) et la chloramine-T (Hayakawa *et al.*, 1997).

### 2.6. Autres méthodes particulières

D'autres méthodes furent également développées pour la mise en évidence et l'isolement des groupes particuliers d'actinomycètes. Parmi ces méthodes, celle appelée technique du "baiting" et utilisant la paraffine comme seule source de carbone, pour détecter la présence des *Nocardiae* (Orchard *et al.*, 1977).

Palleroni (1980) exploita la réponse chimiotactique des spores mobiles aux ions chlorures, pour l'isolement sélectif des *Actinoplanes*.

La technique de centrifugation a été conçue pour l'isolement sélectif d'actinomycètes à spores mobiles tels que les souches des genres *Planomonospora*, *Planobispora* et *Sporichthya*. Après centrifugation, le surnageant contenant les zoospores d'actinomycètes est étalé sur un milieu approprié (Makkar et Cross, 1982; Suzuki *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000).

### 2.7. Isolement sélectif des genres *Streptosporangium*, *Planomonospora* et *Planobispora*

Les *Streptosporangium* sont isolés en très petits nombres (ou parfois absents) par les méthodes traditionnelles, en raison de leur fréquence (un peu rare), de leur croissance lente sur les boîtes d'isolement et leur incapacité à rivaliser avec les autres actinomycètes à croissance plus rapide. Des méthodes sélectives ont ainsi été développées pour leur isolement. Ces méthodes exploitent la capacité des spores à résister à la chaleur sèche (Nonomura et Ohara, 1969a), à l'irradiation aux micro-ondes (Kizuka *et al.*, 1997; Bulina *et al.*, 1998) et aux agents chimiques toxiques comme le chlorure de benzéthonium (Hayakawa *et al.*, 1991a) et la chloramine-T (Hayakawa *et al.*, 1997) ou encore aux antibiotiques comme la leucomycine (Hayakawa *et al.*, 1991b) ou la tobramycine (Terekhova *et al.*, 1991).

Le genre *Planomonospora* est très rare; il a été isolé en très petits nombres et à partir d'échantillons réduits. En 1994, Mertz isola deux nouvelles espèces de *Planomonospora* (*Pm. alba* et *Pm. sphaerica*) par la technique du "baiting" en employant comme appât, des lames d'herbe stériles flottant sur la surface de l'eau. Puis, en 2001a, Suzuki *et al.* développèrent une autre méthode sélective pour son isolement. L'échantillon de sol est suspendu dans une solution d'immersion renfermant 0,1% de lait écrémé, incubé pendant 90 min puis centrifugé avant d'être étalé sur le milieu "acides humiques - traces de sels - gomme gélifiante". Cette méthode a permis d'isoler 246 souches de *Planomonospora* à partir de 137 échantillons de sol parmi les 1200 analysés.

Le genre *Planobispora* est encore plus rare dans le monde. Schäfer (cité par Vobis 1989) a isolé des souches de *Planobispora* à partir d'un échantillon de sol collecté en Namibie par la technique du "baiting" en utilisant le pollen et les cheveux. En 1997, Kizuka *et al.* isolèrent des souches de *Planobispora* par la méthode de centrifugation dans une région aride d'Afrique du Sud. En 2001b, Suzuki *et al.* développèrent une méthode efficace :



le sol traité à la chaleur sèche, est suspendu dans une solution d'immersion alcaline à base de lait écrémé ; la suspension est étalée sur le milieu de culture " acides humiques - traces de sels - gomme gélifiante " (pH 9,0) additionné de cinq agents anti-microbiens. Ces auteurs obtiennent ainsi 119 souches de *Planobispora* à partir de 51 échantillons de sol, parmi les 1467 analysés.

### III. IMPORTANCE DES ACTINOMYCÈTES

Si quelques espèces d'actinomycètes sont pathogènes, la majorité sont cependant très utiles. Leur hétérogénéité métabolique et leur diversité écologique assez exceptionnelles font d'eux des producteurs potentiels de nombreuses molécules à propriétés très diverses et intéressantes dans les domaines médical, vétérinaire, agronomique et industriel (Peczynska-Czoch et Mordarski, 1988; Sanglier *et al.*, 1993).

#### 1. Importance dans les domaines médical, vétérinaire et industriel

---

Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les micro-organismes en tant que producteurs d'antibiotiques et de nombreux autres composés utiles comme les enzymes et les vitamines (Sanglier *et al.*, 1993; Takahashi et Omura, 2003). Ils sécrètent près de 70% des molécules antibiotiques d'origine microbienne. Parmi les antibiotiques d'origine actinomycétale, 75% sont produits par le seul genre *Streptomyces* (Miyadoh, 1993; Strohl, 1997; Watve *et al.*, 2001).

Les antibiotiques sécrétés par les actinomycètes sont utilisés comme agents antibactériens, antifongiques (de nombreuses molécules) ou antiviraux (nucléosides, etc.). Les actinomycètes produisent également des substances à propriétés antitumorales et cytostatiques (carcinostatine, adriamycine, anthramycine, daunomycine, rebeccamycine, etc.), antimitotiques (ansamitocine, etc.), antihistaminiques, analgésiques, vasodilatateurs, inhibiteurs enzymatiques, immunostimulants et immunosuppresseurs (Tsuboya *et al.*, 1996; Demain, 1999).

A côté de ces molécules, les actinomycètes produisent également des substances ayant des activités antiparasitaires telles que les antimalaria (distamycine), les acaricides (altémicidine, etc.), les anticoccidiens (Lombardi et Crisanti, 1997; Rätty *et al.*, 2002), les insecticides (avermectine, polyoxines, mikkomycine, etc.), les miticides (tétranactine), les antihelminthiques (avermectines) et les piscicides (antimycine A) (Stapley, 1982; Demain, 1999).

Les antibiotiques ont aussi trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux. Ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies des animaux et des plantes, mais aussi dans l'alimentation (cas de la spiramycine) pour accroître les rendements zootechniques (Schwarz *et al.*, 2001). D'autres antibiotiques ont été spécialement développés pour le marché agricole. Nous citerons l'exemple de la blasticidine, active contre *Piricularia oryzae*, un agent pathogène du riz, la kasugamycine, la validamycine A, les polyoxines, la mildiomycine (Godfrey, 1994; Knight *et al.*, 1997), la gopalamycine (Nair *et al.*, 1994), la tubercidine (Hwang *et al.*, 1994; Hwang et Kim, 1995) et un antibiotique de type manumycine (Hwang *et al.*, 1996), tous utilisées dans le contrôle de diverses maladies fongiques d'arbres fruitiers et de légumes. Ils sont également utilisés

comme herbicides telles que la phosphonothrixine (Takahashi *et al.*, 1995) et la résormycine (Igarashi *et al.*, 1997).

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des actinomycètes. Certaines sont utilisées dans l'industrie alimentaire (glucose isomérase) et dans celle des détergents (protéases) (Moreira *et al.*, 2002). Les glycosidases des actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases, xylanases) et animales (chitinases). Certaines enzymes peuvent avoir des applications médicales (neuraminidases, estérases et oxydases des stérols) ou en biologie moléculaire (endonucléases de restriction).

Les actinomycètes sont non seulement une source riche d'enzymes, mais aussi une source d'inhibiteurs d'enzymes. Plusieurs travaux ont rapporté la diversité de molécules produites par les *Streptosporangium* (Tableau 3). En effet, en plus des nombreux antibiotiques produits (qui seront traités plus loin), les souches de ce genre sécrètent d'autres substances intéressantes comprenant des enzymes (amylase, pectinase et cellulase...), des inhibiteurs d'enzymes (génistéine et molécule K4610422) et des promoteurs de croissance (acide dichloroisoéverninique) utilisables comme additifs nutritionnels aux animaux (Erwin *et al.*, 1981; Bischoff *et al.*, 1981).

## 2. Importance dans le domaine agronomique

---

Les actinomycètes jouent un rôle très important dans les phénomènes de biodégradation et detransformation de la matière organique. Ils peuvent dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, la chitine et les lignocelluloses des plantes (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Goodfellow *et al.*, 1984). Ils jouent par conséquent un rôle important dans la fertilité des sols. Grâce à un potentiel enzymatique riche (ligninases, cellulases, xylanases, amylases, protéases et chitinases), les actinomycètes peuvent dégrader la biomasse et décomposer des déchets agricoles ou urbains (Goodfellow *et al.*, 1984). Ils sont également capables de dégrader ou de transformer certaines toxines produites par des champignons toxinogènes (mycotoxines) et réduire ainsi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (Holzapfel *et al.*, 2002).

Tableau 3. Liste récapitulative des principales substances produites par les *Streptosporangium*.

Substances	Origine	Références
Isoamylase	<i>Streptosporangium roseum</i>	Ueda et Yagisawa, 1970.
Pectine transéliminase	<i>Streptosporangium</i> sp.	Kaiser, 1971.
Pullulanase (1,6-glucosidase)	<i>Streptosporangium</i> sp.	Masuda et Sugimoto, 1971.
Glucose isomérase	<i>Sg. album</i> et <i>Sg. vulgare</i>	Nonomura et Kaji, 1974.
Acide dichloroisoéverminique [4101-80-8] (additif nutritionnel)	<i>Streptosporangium</i> sp.	Erwin <i>et al.</i> , 1981.
Génistéine (K-254-I) (inhibiteur d'enzyme nucléotide phosphodiesterase)	<i>Sg. vulgare</i>	Joji <i>et al.</i> , 1987.
L-aminoacylase thermostable	<b>Streptosporangium NC26</b>	Kuwabara <i>et al.</i> , 1991.
Cellulase (fertilisant)	Diverses souches de <i>Streptosporangium</i>	Mba, 1996.
K4610422 (inhibiteur de la 5 $\alpha$ -réductase)	<b>Streptosporangium sp. SANK62195</b>	Sugano <i>et al.</i> , 1997.
Glucoamylase	<b>Streptosporangium sp.</b>	Stamford <i>et al.</i> , 2002.

Grâce à leurs propriétés antagonistes, les actinomycètes sont également utilisés dans la lutte biologique des maladies des plantes. Les expériences menées dans ce sens révèlent des résultats prometteurs (Misato, 1982; Goodfellow et Williams, 1983; Moustiri, 1992; Merrouche, 2000; Meklat, 2004).

Le genre *Frankia* vit en association avec de nombreux arbres tel que *Casuarina* et forme des nodules racinaires où l'azote gazeux est fixé. Le système *Frankia*-plantes ligneuses fixe globalement presque autant d'azote que le système *Rhizobium*-légumineuses (Lechevalier, 1981; Vessey, 2003).

### 3. Autres rôles

Les actinomycètes interviennent dans la dégradation des hydrocarbures (Essien et Udosen, 2000), dans la minéralisation du phénol et des déchets des industries textiles et de teinture (Bhatena *et al.*, 2002). Certaines substances, comme la pimarinine, sont utilisées pour le traitement des emballages et d'autres pour la protection de certains fromages (Block, 1983; Vandamme, 1985).

## IV. LES ANTIBIOTIQUES

### 1. Généralités

Les grands progrès réalisés dans le domaine de la chimiothérapie anti-infectieuse, depuis l'âge de la pénicilline et des sulfamides jusqu'à celui des céphalosporines et des nouvelles quinolones, permet actuellement aux médecins de lutter, d'une façon efficace, contre la plupart des agents infectieux. De nos jours, plusieurs antibiotiques sont connus mais leur utilisation croissante tend à entraîner des cas de résistance parfois alarmants, ce qui a exigé

la poursuite des recherches dans ce domaine. À l'heure actuelle, des milliers d'antibiotiques sont découverts, dont seulement 2% sont utilisés dans les domaines médical, vétérinaire, agro-alimentaire et agricole (Thiele-Bruhn, 2003).

### 1.1. Classification

Les antibiotiques constituent un groupe hétérogène de molécules biologiquement actives présentant différentes structures chimiques. Ils peuvent être classés selon plusieurs critères: la structure chimique, l'origine, le mécanisme d'action et le spectre d'action. (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Yala *et al.*, 2001).

#### 1.1.1. Classification selon la structure chimique

Berdy *et al.* (1987) proposèrent un système de classification ouvert à toutes les molécules. Ce système fait apparaître neuf grandes familles présentées dans le tableau 4.

#### 1.1.2. Autres classifications

D'autres types de classifications sont utilisés en médecine, en toxicologie et en pharmacologie. Ces classifications sont basées sur le spectre d'action, le type d'action, le mode d'action, l'origine de l'antibiotique ou sa charge électrique.

Le spectre d'action des antibiotiques peut être large (tétracyclines, céphalosporine C, etc.), moyen (nombreuses molécules) ou très étroit (novobiocine, polymyxines, etc.).

Selon leur type d'action, les antibiotiques sont classés en bactéricides et bactériostatiques (activité contre les bactéries) ou fongicides et fongistatiques (activités contre les champignons). Les antibiotiques bactéricides peuvent tuer les microbes en phase de croissance uniquement ( $\beta$ -lactamines) ou en phase de latence et de croissance (streptomycine, polymyxines, bacitracine). Les antibiotiques bactériostatiques inhibent la croissance des microbes, mais ne les tuent pas. C'est le cas des tétracyclines, du chloramphénicol, de l'érythromycine, de la lincomycine, etc.

Tableau 4. Classification des antibiotiques d'après leurs structures chimiques (Berdy *et al.*, 1987).

## RÉTROSPECTIVE SUR LES ACTINOMYCÈTES ET LEURS ANTIBIOTIQUES

Familles	Principales sous-familles	Exemples d'antibiotiques
Antibiotiques contenant des glucides	- Glucides purs - Aminoglycosides - Glycopeptides	- Nojirimycine - Streptomycine, gentamicine, kanamycine - Vancomycine, risotocétine
Lactones macrocycliques	- Macrolides - Polyènes - Macrolactames	- Erythromycine, spiramycine - Nystatine, amphotéricine - Maytansine
Quinones et antibiotiques apparentés	- Composés polycycliques linéairement condensés - Anthraquinones - Naphtoquinones - Benzoquinones	- Tétracyclines - Anthracyclines - Rubomycine - Mitomycine, saframycine
Acides aminés et peptides	- Dérivés d'acides aminés - Homopeptides - Peptides - Lipopeptides	- Pénicilline, cyclosérine - Bacitracine - Valinomycine - Polymyxines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	- Hétérocycles non condensés - Hétérocycles condensés	- Mildiomycine - Phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	- Dérivés du furane - Polyéthers	- Monensine
Antibiotiques aromatiques	- Composés benzéniques - Composés aromatiques condensés - Autres dérivés	- Chloramphénicol - Griséofulvine - Novobiocine
Antibiotiques alicycliques	- Dérivés du cyclo-alcane - Terpènes - Oligoterpènes	- Cycloheximide - Acide marasmique - Acide fusidique
Antibiotiques aliphatiques	- Dérivés d'alcane - Dérivés des acides carboxyliques aliphatiques - Composés contenant du phosphore	- Elaiomycine - Cérulénine - Fosfomycine

Le mode d'action des antibiotiques est diversifié. Ils agissent par inhibition de réactions de synthèse variées en se fixant sur des sites précis ou cibles moléculaires. Ces derniers correspondent à six niveaux différents de la cellule bactérienne ou fongique: la paroi (pénicilline, cyclosérine, novobiocine), la membrane plasmique (polymyxines, tyrothricine, polyènes), le génome (réplication et transcription de l'ADN) (mitomycine, actinomycine), les ribosomes (traduction de l'ARN messager et arrêt de la synthèse protéique) (tétracyclines, chloramphénicol, érythromycine, etc).

Les antibiotiques sont élaborés par divers organismes vivants. Ils peuvent être d'origine fongique (pénicillines, céphalosporines, griséofulvine), bactérienne (bacitracine, polymyxines) ou actinomycétale, surtout le genre *Streptomyces* (la majorité des antibiotiques) ou encore végétale ou animale. Ils peuvent également être produits par des microorganismes hybrides (clonage de gènes), par hémisynthèse ou par synthèse chimique totale.

Enfin, les antibiotiques peuvent être à caractère acide (ex.: pénicilline, céphalosporine, novobiocine), basique (ex.: la majorité des macrolides) ou neutre (plusieurs molécules dont les steffimicines, aldgamycines, nogalamycines, mutactimycines).

### 1.2. Microorganismes producteurs

Lazzarini *et al.* (2000) rapporte que plus de 23 000 antibiotiques d'origine naturelle ont été découverts jusqu'à 2000, parmi lesquels, près de 60% sont synthétisés par les bactéries

(actinomycètes compris), environ 10% par les champignons, et le reste par les végétaux (surtout) et les animaux.

### 1.2.1. Les bactéries non mycéliennes et les champignons

Les bactéries non mycéliennes produisent environ 13% des antibiotiques d'origine microbienne, dont 8% sont sécrétés par les *Bacillaceae*, 2,3% par les *Pseudomonadaceae* et 2,7% par d'autres bactéries appartenant à des genres très divers tels que *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Proteus*, etc. (Breton *et al.*, 1989).

Parmi les champignons producteurs, nous citerons les genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Coleophoma* (champignons imparfaits, ascomycètes) et aussi certains basidiomycètes et zygomycètes (Laskin et Lechevalier, 1984; Barrett, 2002). Les antibiotiques sécrétés les plus connus sont la pénicilline, la céphalosporine, l'acide fusidique et la griséofulvine.

En fait, le nombre d'antibiotiques commercialisés d'origine fongique est faible, les plus importants étant les  $\beta$ -lactamines (pénicillines et céphalosporines).

### 1.2.2. Les actinomycètes

Les actinomycètes constituent la principale source d'antibiotiques, avec près de 64% des molécules d'origine microbienne. Le genre *Streptomyces* est, de loin, le plus grand producteur (Watve *et al.*, 2001; Lazzarini *et al.*, 2000). En effet, environ 80% des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes proviennent de *Streptomyces* et plusieurs sont commercialisés, à savoir, la streptomycine, la kanamycine, l'oxytétracycline, le chloramphénicol, l'érythromycine, la néomycine, la novobiocine, la nystatine, etc. Parmi les genres producteurs autres que *Streptomyces*, nous pouvons citer *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Nocardiosis* et *Saccharothrix*. Les genres les plus rares ne produisent relativement que peu de molécules actives (près de 3 %).

Parmi les molécules élaborées par les actinomycètes, seules 20% sont des antifongiques, les 80% restantes, ont des activités biologiques diverses: antibactériennes (surtout), antivirales, antitumorales, antiprotozoaires, insecticides, etc. (Sanglier *et al.*, 1993).

### 1.2.3. Les genres *Streptosporangium*, *Planomonospora* et *Planobispora*

Ces trois genres sont connus dans la littérature par la production de très peu d'antibiotiques (environ 0,7% du total des antibiotiques d'origine actinomycétale). Des trois genres, *Streptosporangium* est celui qui produit le plus grand nombre de molécules actives, même si un nombre relativement faible de souches a été exploité en comparaison avec les genres *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Streptomyces* et autres actinomycètes.

Depuis la découverte de la sibiromycine (premier antibiotique isolé en 1969), environ trente cinq molécules bioactives appartenant à diverses classes chimiques (anthracyclines, peptides, macrolactames, aromatiques, phénazines, etc.) ont été décrites pendant les trente dernières années. Le tableau 5 montre l'ordre chronologique des antibiotiques découverts et produits par *Streptosporangium* spp.

Le genre *Planomonospora* quant à lui, sécrète trois antibiotiques antibactériens ; la sporangiomycine (peptide) produite par *Pm. parontospora* sous-espèce *antibiotica*

(Thiemann *et al.*, 1968), le thiostrepton (peptide) sécrété par *Pm. sphaerica* et un troisième antibiotique (nature chimique non déterminée) par *Pm. alba* (Mertz, 1994).

Un seul antibiotique est élaboré par *Planobispora*, plus précisément *Pb. rosea*, de nature peptidique thiazolé (Selva *et al.*, 1991; Tavecchia *et al.*, 1994).

**Tableau 5. Antibiotiques sécrétés par *Streptosporangium*.**

## Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens

Année	Produit et origine	Nature chimique	Propriété	Référence
1969	Sibiromycine <i>S. sibiricum</i>	Benzodiazépine, type anthramycine	Antinéoplastique	Gauze <i>et al.</i> , 1969.
1973	Carminomycine I <i>Streptosporangium</i> sp.	Anthracycline, type daunomycine	Antinéoplastique, anti-Gram+, anti-protistes et anti-levures	Brazhnikova <i>et al.</i> , 1973.
1975	Victomycine <i>S. violaceochromogenes</i>	Glycopeptide, type bléomycine	Antibactérien, antitumoral	Kawamoto <i>et al.</i> , 1975.
1975	Platomycines A et BS. <i>violaceochromogenes</i>	Glycopeptides, type bléomycine	Antibactériens et antitumoraux	Takasawa <i>et al.</i> , 1975.
1975	Streptosporangiomycine <i>S. vulgare</i>	Dérivé de sucre, type everninomycine	Non mentionnée	Coronelli <i>et al.</i> , 1975.
1975	Sporacuracines A et BS. <i>vulgare</i> var. <i>eborea</i>	Dérivé de sucre, type everninomycine	Antibactériens : anti-Gram+	Atsushi <i>et al.</i> , 1975.
1976	Sporamycine <i>S. pseudovulgare</i>	Protéine basique	Antitumoral	Umezawa <i>et al.</i> , 1976.
1977	CP 43334 <i>S. cinnabarinum</i> et <i>S. koreanum</i>	Peptolide, type virginiamycine	Antibiotique	Celmer <i>et al.</i> , 1977.
1977	CP 43596 <i>S. koreanum</i>	Peptolide, type virginiamycine	Antibiotique	Celmer <i>et al.</i> , 1977.
1978	Acide figaroïque <i>Streptosporangium</i> sp.	Anthracycline, type daunomycine	Antibiotique	Bradner <i>et al.</i> , 1978.
1978	Thiosporamycine <i>S. roseum</i>	Peptide thiazolyl, type thiostrepton	Antibactérien anti-Gram+	Celmer <i>et al.</i> , 1978.
1979	SS-237 <i>Streptosporangium</i> sp.	Nucléoside	Herbicide	Berg <i>et al.</i> , 1979.
1979	SF-2033 <i>S. vulgare</i>	Dérivé de sucre, type everninomycine	Anti-Gram+, anti-mycoplasmes	Tsuguaki <i>et al.</i> , 1979.
1981	Fragilomycine <i>S. fragile</i>	Anthracycline	Anti-Gram+, anti-anaérobies	Nash III <i>et al.</i> , 1981.
1983	KUD-PC <i>S. pseudovulgare</i>	Protéine basique	Non mentionnée	Umezawa et Komiyama, 1983.
Année	Produit et origine	Nature chimique	Propriété	Référence
1984	1,6-dihydroxyphénazine et 1.6-dihydroxy-2-chlorophénazine <i>Streptosporangium</i> sp. 1656	Phénazine	Antifongiques <i>in vitro</i> , anti-dermophytes et anti- <i>Candida</i>	Patel <i>et al.</i> , 1984.
1985	DC-87 (A et B) <i>Streptosporangium</i> sp.	Anthracycline, type steffimycine	Non mentionnée	Tomita <i>et al.</i> , 1985.
1987	AI-RC 262 <i>Streptosporangium</i> sp.	oligopeptide, "netropsin-like"	Antifongique	Sato <i>et al.</i> , 1987.
1987	SF-2381 (A et B) <i>Streptosporangium</i> sp.	Dérivés de macrolide	Antibiotique	Ito <i>et al.</i> , 1987.
1988	SF-2513 (A, B et C) <i>S. nondiastaticum</i>	Oligopeptide	Antibiotiques inhibiteurs de l'enzyme "angiotensine convertase"	Shokichi <i>et al.</i> , 1988.
40				
1990	Sinéfungine <i>Streptosporangium</i> sp. SCC 1786	Peptidyl-nucléoside	Antifongique	Cooper <i>et al.</i> , 1990.
1991	A-84575 <i>S. carneum</i>	Glycopeptide, type ristocétine	Antibactérien	Michel et Yao, 1991.
1993	Sporangirosomycine <i>S. roseum</i> ssp. <i>antibioticus</i>	Peptolide	Antibactérien anti-Gram+	Ghazal et Abd El-Aziz, 1993.
1994	WS 70089 (A, B et C) <i>S.</i>	Anguvelines	Antibiotiques inhibiteurs	Tsurumi <i>et al.</i>



### 1.3. Spectre d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être actifs contre les bactéries à Gram positif et/ou les bactéries à Gram négatif et/ou les champignons. Leur action peut parfois s'étendre aux virus, aux protozoaires, aux helminthes, aux acariens, aux insectes, etc.

Ainsi, on distingue les antibiotiques à :

- spectre très large ; tétracyclines, gentamicine, chloramphénicol, céphalosporine, etc.
- spectre large ; streptomycine, rifampicine, aminosides, etc.
- spectre moyen, à prédominance sur les bactéries Gram positif : pénicilline, érythromycine, lincomycine, etc.
- spectre étroit : bactéries à Gram positif : vancomycine, novobiocine, etc.  
bactéries à Gram négatif : polymixines, etc.  
champignons : cycloheximide (actidione), amphotéricine B, nystatine, etc.

### 1.4. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent en interférant avec la synthèse de la paroi, l'intégrité de la membrane plasmique, la synthèse des acides nucléiques, la fonction des ribosomes et avec la synthèse de l'acide folique, etc.

Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne agissent par inhibition de la synthèse de ses précurseurs (la D-cyclosérine, la fosfomycine) ou en interférant dans le transport transmembranaire des précurseurs du peptidoglycane (la bacitracine) ou encore par inhibition de l'insertion des unités glycaniques, précurseurs de la paroi, et de la transpeptidation ( [les](#)  $\beta$  [-lactamines](#) inhibent la transpeptidase intervenant dans la synthèse de la paroi et [les glycopeptides](#) se lient à un intermédiaire de synthèse du peptidoglycane).

Les antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique telles que les polymyxines et la tyrothricine, agissent comme des détergents cationiques en pénétrant dans la cellule bactérienne grâce à leur caractère amphipathique, et en s'insérant parmi les phospholipides, perturbant ainsi la perméabilité membranaire. Les polyènes (amphotéricine B, nystatine) sont des antifongiques qui agissent sur les stérols membranaires des cellules eucaryotes (champignons, animaux).

Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique et représentés par différentes classes d'antibiotiques agissent en interférant avec la synthèse protéique bactérienne, et ce, au niveau des différentes étapes de la traduction (l'initiation, l'élongation et la terminaison). Il existe des antibiotiques qui agissent sur la sous-unité 50S ( [macrolides](#) , [lincosamides](#) , [streptogramines](#) , [phénicolés](#) , oxazolidinones), ceux qui agissent sur la sous-unité 30S ( [tétracyclines](#) , [aminoglycosides](#) ) et ceux qui inhibent l'enzyme isoleucyl ARNt synthétase (mupirocine). L' [acide fusidique](#) , en se fixant au facteur d'élongation de la traduction, empêche la fixation des amino-acyl-ARNt.

Certains antibiotiques inhibent le métabolisme des acides nucléiques, tels que les inhibiteurs de l'ARN polymérase ( [ansamycines](#) ), les inhibiteurs de l'ADN-gyrase et de la topoisomérase IV ( [quinolones et fluoroquinolones](#) ) et les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique nécessaire à la synthèse des acides nucléiques ( [sulfamides et triméthoprim diaminopyridines](#) ).

## 1.5. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques. Les facteurs de résistance peuvent être codés sur les plasmides ou sur le chromosome. Différents modes de résistance sont possibles :

- Une baisse de la perméabilité cellulaire impliquant la pénétration réduite de l'antibiotique dans la cellule.
- Une modification de la cible de l'antibiotique induisant une modification de son affinité envers cette cible et donc absence de fixation.
- Une inactivation métabolique des antibiotiques, où les bactéries développent des enzymes capables de modifier les antibiotiques les rendant inactifs. C'est le cas de l'hydrolyse des pénicillines et des céphalosporines par les  $\beta$ -lactamases et céphalosporinases et l'acétylation du chloramphénicol et des tétracyclines.
- Utilisation d'une voie métabolique détournée (cas où l'antibiotique inhibe une voie métabolique).
- Une expulsion active de l'antibiotique ou encore une hyperproduction de la cible.

## 2. Production, purification et détermination des structures des antibiotiques

---

### 2.1. Production

Malgré leur diversité chimique, les antibiotiques naturels sont biosynthétisés à partir d'un nombre réduit de précurseurs fournis par le métabolisme primaire microbien, tels que les acides gras, les acides aminés et les bases puriques et pyrimidiques. Cette variété structurale dépend des chaînes de réactions enzymatiques terminales variées (condensation, polymérisation, méthylation, oxydation et réduction), plutôt que du nombre de voies de biosynthèse de départ qui est d'ailleurs réduit (Vinig, 1985; Martin et Liras, 1989; O'hagan, 1991). Généralement, les antibiotiques synthétisés sont caractérisés par une structure chimique ou noyau de base marquant souvent la voie de biosynthèse dont ils dérivent (polykétides, aminosides, etc.). La classification des antibiotiques en familles est basée sur ces noyaux principaux. Les groupements chimiques latéraux qui viennent se fixer sur le noyau de base permettent de distinguer les sous-groupes et les différents antibiotiques entre eux. L'étude des voies de biosynthèse des antibiotiques a été possible en utilisant des précurseurs marqués et des mutants bloqués à différents stades de la biosynthèse.

Le génome des actinomycètes offre une caractéristique importante utilisable pour améliorer la production des antibiotiques. Les gènes responsables de la biosynthèse, de la régulation et de la résistance aux antibiotiques, sont groupés dans une même région sous forme de "cluster" de 15 à 100 kb ou même plus, ce qui constitue un avantage facilitant la manipulation des gènes et leur transfert chez d'autres espèces (clonage, formation d'hybrides). Ce matériel génétique est souvent porté par l'ADN génomique mais parfois aussi par des plasmides (ex. : la méthylénomycine produite par *Streptomyces coelicolor*). Ainsi, la production de la pénicilline a pu être améliorée et dépasse actuellement les 40 g/L alors que les souches sauvages ne produisaient que des traces d'antibiotiques (1 à 20 mg/L) (Larpen et Sanglier, 1989).

Au cours des fermentations, la production des antibiotiques débute vers la fin de la phase de croissance et se poursuit pendant la phase stationnaire. Elle peut parfois débiter durant la phase exponentielle de croissance comme cela a été montré dans certains travaux (Lebrihi *et al.*, 1987; Lamari *et al.*, 2002a).

Au cours d'une cinétique de fermentation, plusieurs facteurs influencent la croissance et la production des antibiotiques. La composition des milieux de culture (sources de carbone et d'azote, phosphate inorganique, sels minéraux, oligo-éléments, précurseurs, vitamines, etc.) et les paramètres physiques de fermentation (pH, température, taux d'oxygénation et type et vitesse d'agitation) sont choisis et contrôlés. Les conditions requises pour la production des antibiotiques ne sont pas nécessairement identiques à celles permettant une bonne croissance. Pour la plupart des microorganismes producteurs, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse, par répression catabolique ou « effet glucose ». La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures influe sur les rendements. De nombreuses synthèses peuvent être inhibées par des excès d'ions ammonium ou d'autres sources d'azote rapidement métabolisables (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992; Spížek et Tichý, 1995). En revanche, d'autres substances ont un effet positif sur la production. C'est le cas du  $\text{CaCO}_3$  qui joue le rôle de tampon empêchant des variations importantes du pH, favorisant ainsi la production de la biomasse et des antibiotiques. Plusieurs travaux ont rapporté l'utilisation bénéfique du  $\text{CaCO}_3$  en fermentation pour les actinomycètes (Igarashi *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 2000; etc.).

### 2.2. Purification

Les méthodes de purification dépendent des caractéristiques de la molécule à déterminer et de sa concentration dans le milieu de fermentation. Tout au long du processus de purification, il est important d'effectuer des contrôles microbiologiques (bioautographie et antibiographie). Les techniques de séparation sont souvent accompagnées de tests de révélations chimiques (chromogéniques), spectroscopiques (UV-visible, infrarouge) pour la détection des antibiotiques ainsi que pour avoir des informations sur leur nature.

L'extraction (première étape) élimine la plus grande partie des constituants du milieu de fermentation. C'est souvent une extraction liquide-liquide avec utilisation des solvants organiques de polarités différentes. Les différents extraits organiques et aqueux sont testés afin de déterminer le solvant approprié pour les extractions ultérieures.

Les étapes suivantes nécessitent des méthodes de purification plus fines adaptées à de petites quantités de produit. Il s'agit de la chromatographie sur papier (CP), sur couche mince (CCM), sur colonne à basse pression ou encore à haute pression. Cette dernière ou chromatographie liquide à haute pression (HPLC), est une technique rapide et efficace permettant d'aboutir à la purification totale des antibiotiques. Elle est particulièrement utilisée pour séparer des complexes d'antibiotiques.

En fonction de la phase stationnaire et du principe opérationnel en chromatographie liquide, plusieurs modes de séparation sont possibles:

- chromatographie d'adsorption où les composés à purifier sont adsorbés sur un support solide (phase stationnaire). Ex : gel de silice, charbon actif, etc.

- chromatographie de partage (liquide-liquide): la séparation est basée sur le partage des constituants de l'échantillon entre deux phases liquides. On distingue la chromatographie à phase normale et la chromatographie à phase inversée. Cette dernière a connu les plus grandes applications pour la purification des antibiotiques.

- chromatographie d'exclusion stérique (filtration sur gel): la phase stationnaire est un matériel poreux de dimensions déterminées et les composants de l'échantillon sont séparés suivant leur taille. Actuellement, des résines de synthèse (gel de Séphadex) résistantes aux solvants organiques sont également utilisées.

- chromatographie par échange d'ions: la phase stationnaire comporte des ions de signe opposé à ceux des composants de l'échantillon d'où la possibilité de formation de liaisons ioniques entre les deux. La séparation est basée sur la différence de charges (types et intensité) que portent ces composants.

Un exemple de protocole général de purification souvent rencontré dans le cas des antibiotiques est illustré par la figure 4.

### 2.3. Détermination des structures chimiques

La caractérisation de la structure chimique d'un antibiotique se fait avec un produit pur. Différentes analyses spectroscopiques, physico-chimiques et chromatographiques sont utilisées.

Une chromatographie sur papier ou sur couche mince, suivie de révélations avec différents réactifs chimiques, permet une première estimation du nombre de molécules actives et l'obtention d'informations sur leur nature chimique.

L'analyse élémentaire permet de calculer les pourcentages des éléments qui composent les molécules des antibiotiques et de déduire leurs formules chimiques.

Parmi les méthodes spectroscopiques principalement utilisées, nous citerons la spectroscopie d'absorption en lumière ultra-violette et visible (UV-VIS), la spectrométrie infrarouge (IR), la spectrométrie de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN du proton et du carbone 13).

La spectroscopie UV-VIS permet de détecter la présence de chromophores, de liaisons conjuguées et de certains groupements fonctionnels. Elle est très utile pour détecter les composés aromatiques et les systèmes insaturés et conjugués. C'est le cas des polyènes qui possèdent des spectres d'absorptions caractéristiques (Martin, 1979; Chan et Aszalos, 1987).

La spectroscopie IR détermine les groupements fonctionnels dont certains (NH<sub>2</sub>, OH, CO, etc.) possèdent une bande d'absorption caractéristique, quelle que soit la substance considérée. Les spectres obtenus sont comparés avec ceux déjà enregistrés dans les banques de données (Rouessac, 1992).

Par ionisation des molécules, la spectrométrie de masse (MS) fournit le poids moléculaire et des indications sur la structure. Celle à haute résolution, fournit en plus, la formule chimique élémentaire. Les méthodes d'ionisation les plus utilisées sont l'ionisation chimique (IC) et l'ionisation par bombardement avec des atomes rapides (FAB : Fast Atom Bombardment). Le couplage LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) permet aujourd'hui la détermination des masses moléculaires de tous les composants d'un profil chromatographique (Rouessac, 1992).

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et celle du carbone 13 est une technique qui, en soumettant la molécule à un champ magnétique, permet d'analyser sa conformation et sa stéréochimie. Le spectre RMN se présente sous la forme de pics caractérisant les déplacements chimiques. Il existe des tables de corrélation qui aident à

identifier chaque type de proton ou de carbone en fonction de son déplacement chimique (Rouessac, 1992).

La mise au point de la technique RMN à deux dimensions (RMN 2D) permet d'analyser avec une haute résolution, la structure de molécules. Les spectres 2D aident à interpréter les spectres 1D puisque en une seule expérience, les protons sont couplés entre eux (COSY,  $^1\text{H-H}$ ) ou couplés avec les carbones correspondants (HMBC,  $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ ).

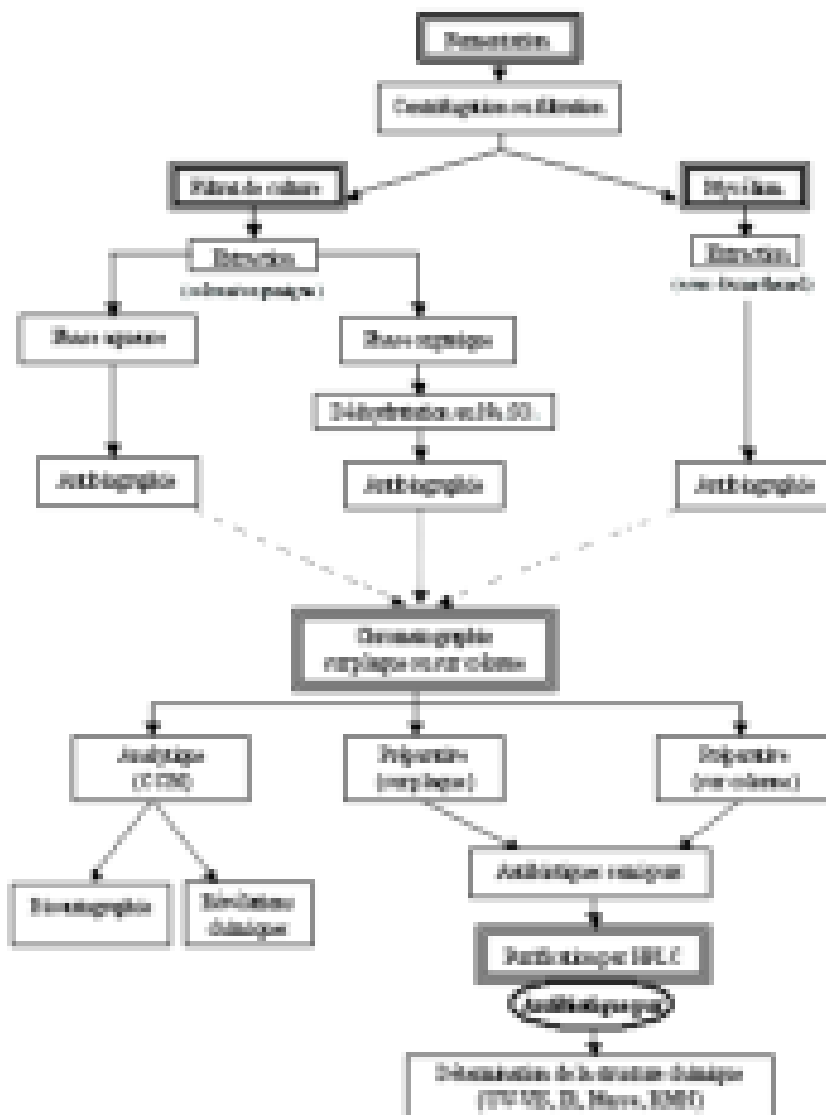


Figure 4. Exemple de protocole général de purification des antibiotiques.

### 3. Données sur quelques groupes d'antibiotiques

Les trois isolats de *Streptosporangium* étudiés dans cette thèse, sécrètent trois grands groupes d'antibiotiques; les angucyclines, les aminoglycosides et les antifongiques (voir partie 3, résultats et discussions). Il est intéressant de présenter les données bibliographiques relatives à ces groupes d'antibiotiques.

### 3.1. Les angucyclines

Les angucyclines représentent le troisième groupe de déca-kétides tétracycliques après les tétracyclines et les anthracyclines. Ils possèdent comme caractéristique structurale commune, un noyau tétracyclique aglycone de type benz[a]anthracène, caractérisé par quatre cycles dont le quatrième est orienté de manière angulaire (Rohr et Thiericke, 1992; Krohn et Rohr, 1997).

Les angucyclines sont un groupe de produits naturels bioactifs qui ont été découverts de manière aléatoire lors de criblages de substances antibactériennes et antitumorales. Ces antibiotiques ont connu un développement rapide et actuellement, de nouveaux membres sont découverts par des méthodes de criblage plus spécifiques et orientées. Leur nombre est actuellement supérieur à 150. Ce sont des métabolites secondaires produits par plusieurs souches de *Streptomyces* et possédant de multiples propriétés biologiques intéressantes. Celles-ci vont des traditionnelles activités anticancéreuses, antivirales et antibactériennes à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Krohn et Rohr, 1997).

#### 3.1.1. Structure et classification

Les angucyclines sont subdivisées en angucyclines proprement dits et en angucyclinones. Les termes 'angucycline' et 'angucyclinone' ont été introduits en 1984 (Drautz *et al.*, 1986). Ces deux types d'antibiotiques présentent dans leur structure de base, le noyau benz[a]anthracène angulaire (figure 5) qui dérive biosynthétiquement d'une chaîne déca-kétide formée via la voie polykétide de biosynthèse (Rohr et Thiericke, 1992). Le terme angucycline désigne ceux possédant en plus, des parties sucres hydrolysables liées au noyau principal par une liaison O-glycosidique, tandis que le terme angucyclinone est attribué à ceux n'ayant pas de sucre ou bien, possédant une partie sucre mais liée au noyau principal par une liaison C-glycosidique (Rohr et Thiericke, 1992).

Les premières angucyclines dont la structure a été déterminée sont la tétrangomycine (Dann *et al.*, 1965) et le tétrangulol (Kunstmann et Mitscher, 1966). Par la suite, les structures de l'ochromycinone (Bowie et Johnson, 1967) de l'aquamycine (Nagatsu *et al.*, 1968; Sezaki *et al.*, 1970) et de la rabélomycine (Liu *et al.*, 1979) ont été décrites. La figure 6 illustre quelques exemples d'angucyclines et angucyclinones.

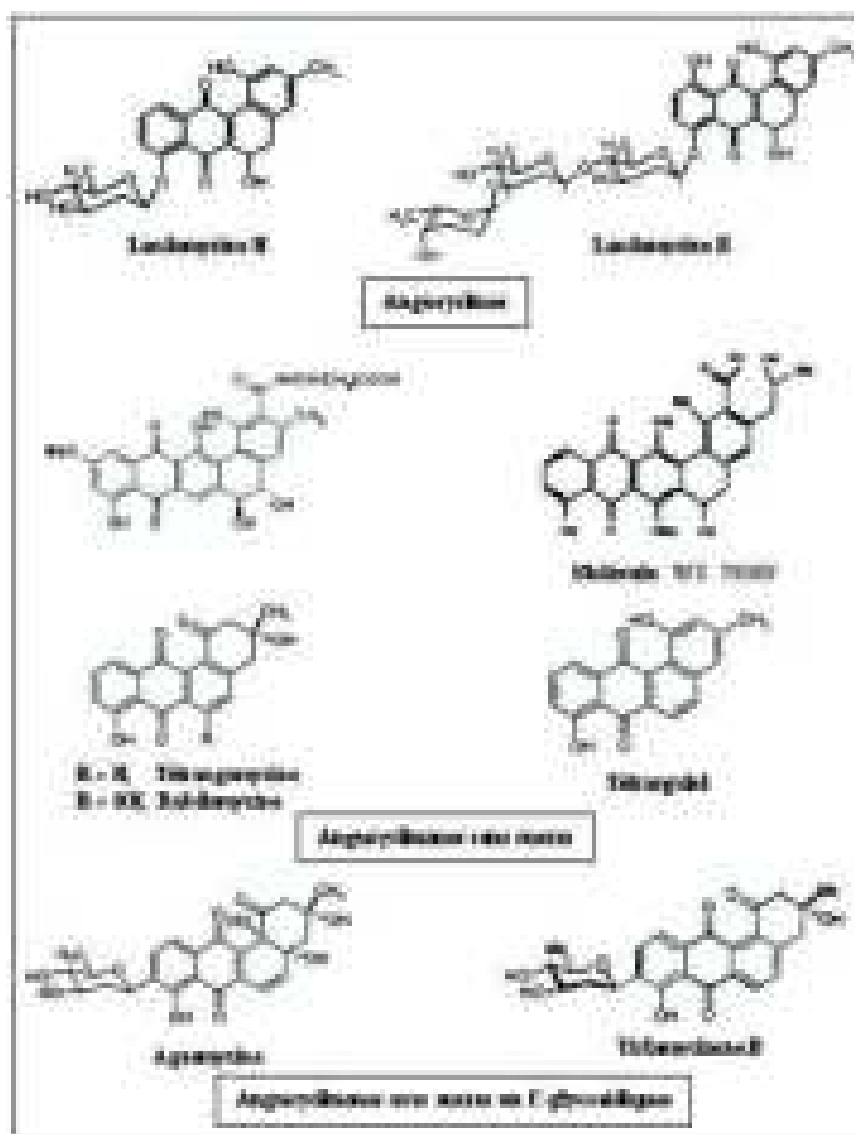
Rohr et Thiericke (1992) ont classé les antibiotiques du groupe angucycline selon le degré d'oxygénation et la formation du C-glycoside. Une vue d'ensemble du système de classification orienté biosynthétique de ces antibiotiques est récapitulée dans la figure 7. Selon la formation du C-glycoside, les angucyclines/angucyclinones sont divisées en deux types principaux, lesquels sont subdivisés chacun en deux autres types sur la base du degré d'oxygénation.

#### 3.1.2. Biosynthèse

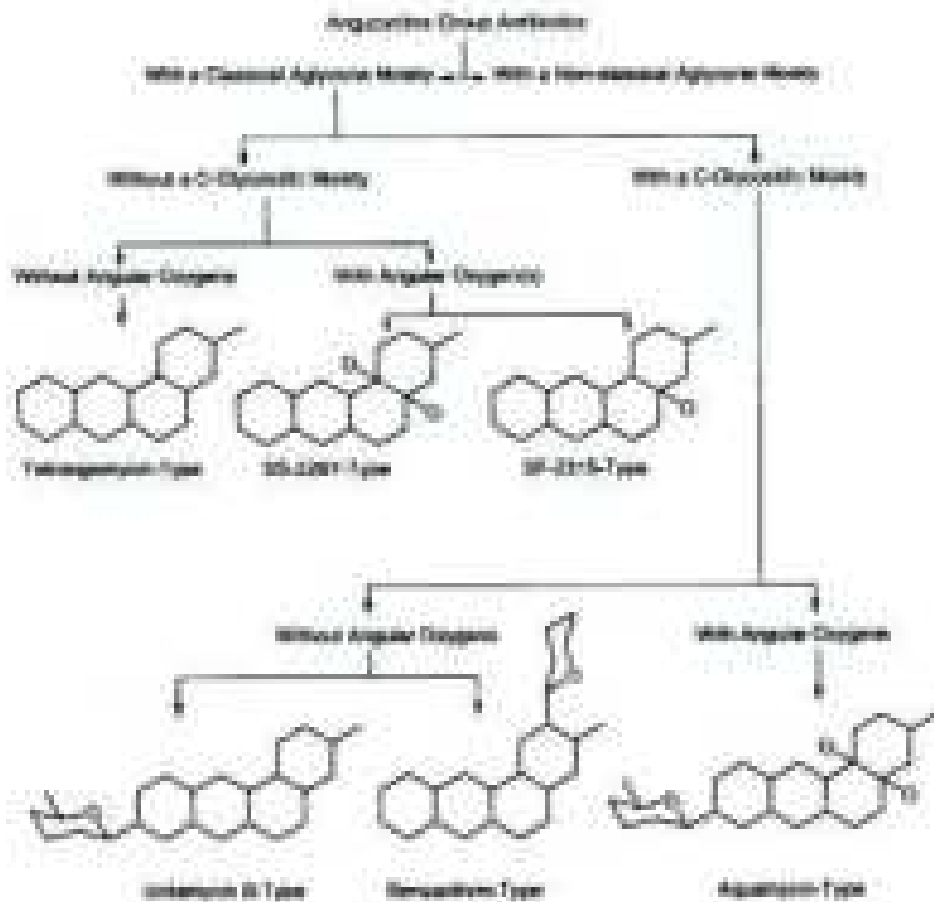
Les angucyclines et les métabolites apparentés (anthracyclines et tétracyclines) sont des polykétides aromatiques qui représentent un grand groupe de produits naturels avec des structures et des activités biologiques très diversifiées. Malgré la diversité structurelle rencontrée chez les différents polykétides aromatiques, ils résultent tous d'une même voie de biosynthèse qui a été élucidée pour plusieurs représentants de cette classe de produits naturels (Hopwood, 1997). La biosynthèse commence par la condensation d'un nombre spécifique de petits acides carboxyliques par l'action itérative du complexe polykétide synthase minimal (minPKS), qui consiste en deux kétosynthases ( $KS_{\alpha}$  et  $KS_{\beta}$ ) et une

protéine de transport acyle (ACP) sur laquelle la chaîne polykétide est attachée via un "bras" phosphopantéthéinyl flexible (O'Hagan, 1991; Rawlings, 1997). Ce complexe d'enzymes catalyse la condensation des précurseurs du kétide monomérique ainsi que le pliage et les cyclisations du noyau (réactions aldoles) de la forme finale multicyclique (Rohr, 1992). La chaîne polykétide est pliée par diverses kétoréductases, cyclases et aromatasés pour donner différents composés aromatiques. Puis, vers la fin, des réactions catalysées par des oxygénases, des méthylases et des réductases, ainsi que des réactions non catalysées, modifient en plus l'aglycone formé. La classification des polykétides est basée sur le nombre d'unités acétates (ou propionates) dans un métabolite.

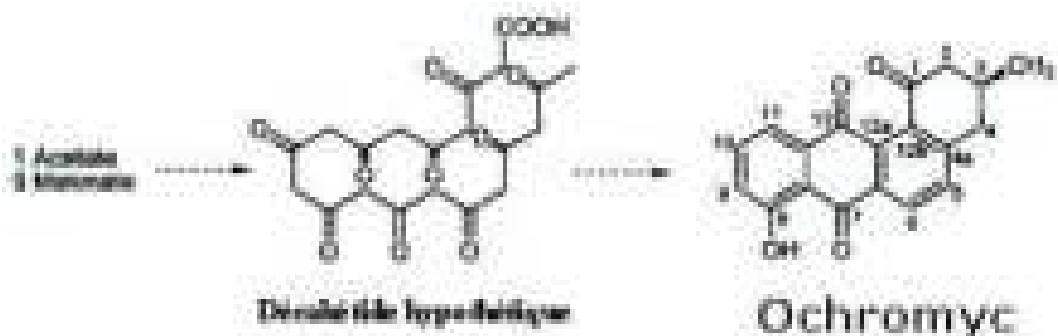
Une hypothèse a été proposée pour la biosynthèse des angucyclin(ou)es. Elle se ferait via un déca-kétide (figure 8), qui commence par un acétyl-CoA et neuf unités malonyl-CoA (Rohr et Thiericke, 1992; Krohn et Rohr, 1997; Sohrab, 2005). Des exceptions sont trouvées pour les brasiliquinones A-C, dont la biosynthèse débute par des unités propionates (Tsuda *et al.*, 1996).



**Figure 6.** Structure de quelques angucyclines et angucyclinones (Patil, 2001; Sohrab, 2005).



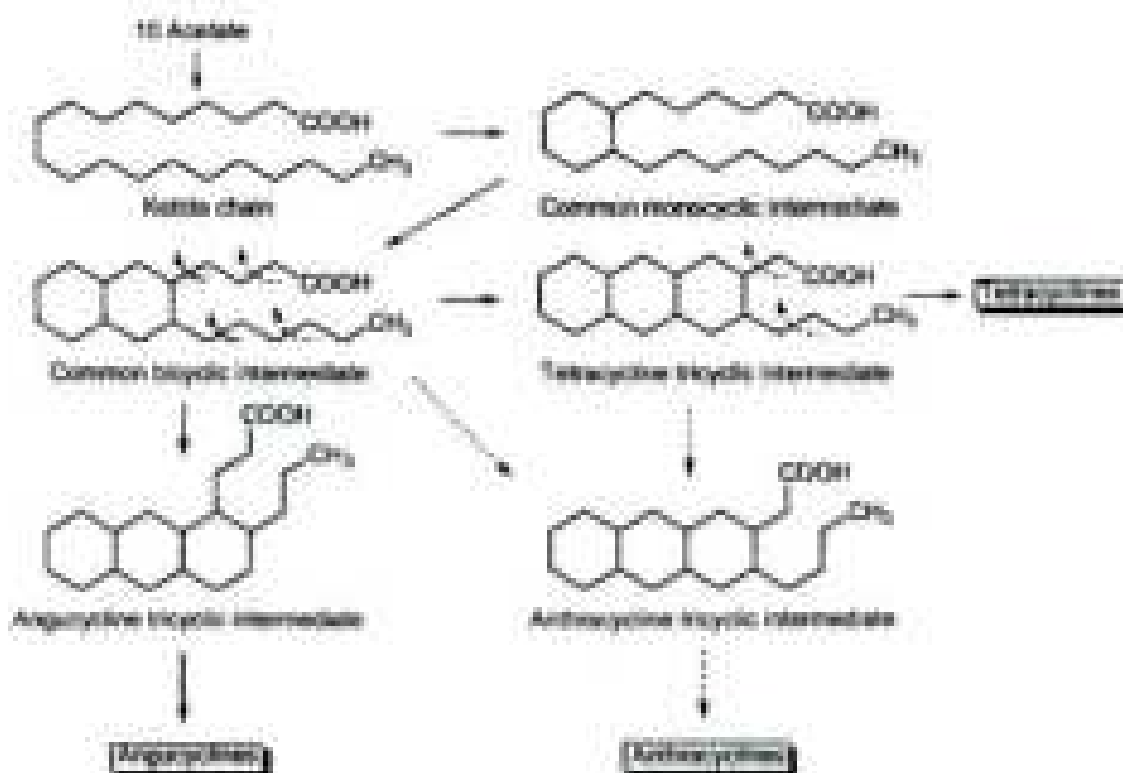
**Figure 7.** Classification biogénérique des antibiotiques du groupe angucycline (Rohr et Thiericke, 1992).



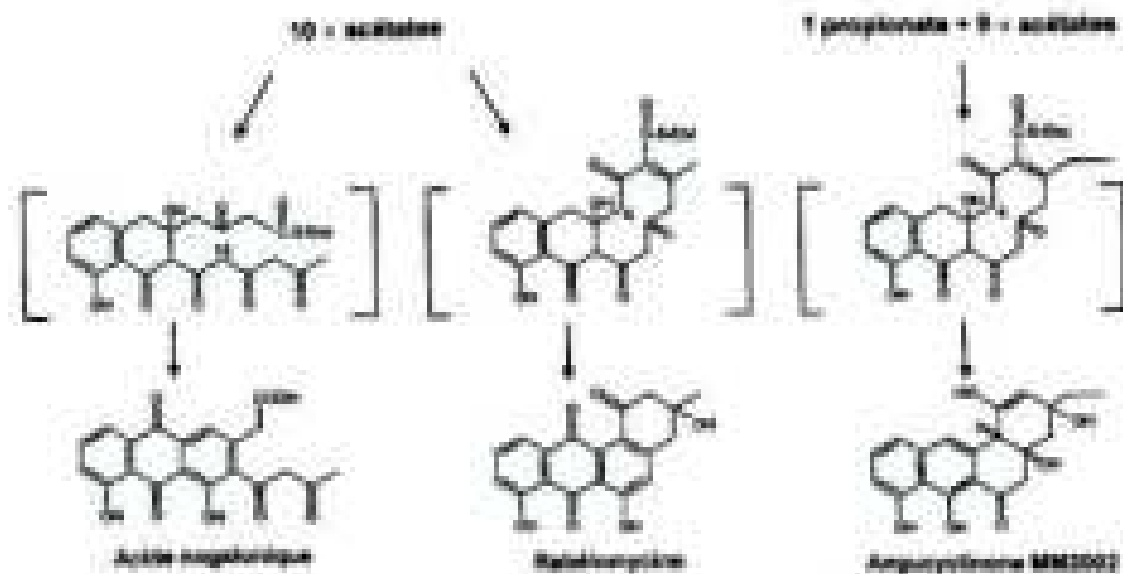
**Figure 8.** Formation biosynthétique typique d'une angucyclinone, l'ochromycinone, à partir d'un décahéptide hypothétique (Sohrab, 2005).

Ainsi, une hypothèse de biosynthèse a été proposée (Rohr, 1992), dans laquelle tétracyclines, anthracyclines et angucyclines sont biosynthétisées selon une voie commune jusqu'à un intermédiaire bi-cyclique, à partir duquel les angucyclines sont élaborées (figures 9 et 10).





**Figure 9.** Hypothèse de la voie de biosynthèse des tétracyclines, anthracyclines et angucyclines: cyclisations successives et intermédiaires communs mono- et bi-cycliques (Rohr, 1992; Sohrab, 2005).



**Figure 10.** Hypothèse des voies de biosynthèses de la rabélomycine. Les structures entre crochets indiquent des intermédiaires hypothétiques (Metsä-Ketelä et al., 2003).

### 3.1.3. Microorganismes producteurs

Les organismes producteurs d'angucyclin(on)es appartiennent presque exclusivement au groupe

des actinomycètes. A l'exception de la pradimicine produite par *Actinomadura verrucosospora* (Dairi *et al.*, 1999), de l'antibiotique WS 79089 produit par *Streptosporangium roseum*, et des sakomycines A-D produites par *Nocardia* sp., toutes les angucyclines sont sécrétées par diverses espèces de *Streptomyces* (Rohr et Thiericke, 1992).

Le groupe des urdamycines est produit par *Streptomyces fradiae* (Decker *et al.*, 1995), la landomycine par *S. cyanogenus* S136 (Westrich *et al.*, 1999), la jadomycine par *S. venezuelae* ISP5230 (Han *et al.*, 1994). Le groupe des kinamycines est sécrété par *S. murayamaensis* (Gould *et al.*, 1998), le tétrangulol et la tétrangomycine par *S. rimosus* et par la souche WP 4669 de *Streptomyces* (Hong *et al.*, 1997).

### 3.1.4. Spectre d'action et toxicité

Depuis leur découverte, les angucyclines ont révélé un spectre antitumoral important. Par la suite, elles ont montré une multitude d'activités biologiques intéressantes telles que des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, inhibitrices d'enzyme et inhibitrices de l'agrégation des plaquettes sanguines (Rohr et Thiericke, 1992; Krohn et Rohr, 1997).

*In vivo*, les activités cytostatiques des kerriamycines peuvent prolonger les périodes de survie des souris inoculées avec les tumeurs ascites d'Erlich. Les vinéomycines montrent une activité contre le sarcome 180, une tumeur solide de la souris. Certains membres des angucyclines inhibent remarquablement la croissance des lignées cellulaires résistantes à différents agents cytostatiques commercialisés (Krohn et Rohr, 1997).

De plus, l'ochromycinone et l'antibiotique YM-181741 sont doués d'une activité sélective contre *Helicobacter pylori*, principale cause de l'ulcère peptique (Peterson, 1991; Nisikawa *et al.*, 2000).

Il n'y a pas de traitement efficace sans quelque risque de toxicité. Pour lutter contre des maladies sérieuses comme le cancer, les traitements employés doivent être puissants et leurs inconvénients sont proportionnels. Les principaux signes toxiques des angucyclines correspondent à son action prépondérante, en freinant ou en arrêtant la prolifération cellulaire. Elle agit surtout sur les tissus où cette prolifération est la plus active. Ainsi sa toxicité majeure s'exprime dans la moelle osseuse qui produit les globules sanguins, et détermine une diminution de ces globules.

### 3.1.5. Synthèse chimique des angucyclines

Des angucyclines naturelles comme la rubiginone B1, la rubiginone B2, l'émycine A, l'ochromycinone, l'hatomarubigine B et l'urdamycinone B, ont fait l'objet d'une synthèse chimique totale (Matsumoto *et al.*, 1995; Krohn *et al.*, 1997; Kendall, 2000; Patil, 2001; Lebrasseur *et al.*, 2004).

Dans d'autres études, la synthèse est partielle. Les gènes de biosynthèse de produits naturels sont typiquement groupés et ainsi susceptibles d'être aisément manipulés génétiquement. La biosynthèse combinatoire implique l'exploitation et la manipulation de ces gènes pour créer de nouvelles combinaisons artificielles de gènes. Les microorganismes recombinants résultants synthétisent des métabolites nouveaux ou "hybrides" en raison de l'effet de nouvelles enzymes sur la voie métabolique. Par

conséquent, des molécules nouvelles jamais signalées dans la nature peuvent être produites et utilisées en thérapeutique (Cane *et al.*, 1998; Hutchinson, 1998).

L'un des domaines émergeant dans le développement de nouvelles molécules polykétides, est la synthèse combinatoire qui consiste à manipuler les systèmes itératifs polykétide synthase de type II (PKS) permettant d'exprimer une variété de combinaisons de la PKS avec des kétoréductases, des cyclases, et d'autres enzymes aboutissant à un jeu de conception pour synthétiser de nouveaux métabolites (Moore et Piel, 2000). Les études innovatrices de Hopwood (1997), sur la polykétide synthase de l'actinorhodine chez *Streptomyces coelicolor* ont démontré l'utilité extraordinaire de cette approche dans la production de diverses molécules (McDaniel *et al.*, 1993 et 1995).

Dans certaines études, les clusters de gène de biosynthèse de quelques angucyclines comme l'urdamycine, la landomycine, la jadomycine, la pradimicine, ainsi que la kinamycine, le tétrangulol et la tétrangomycine, ont été clonés, caractérisés et exprimés dans des hôtes hétérologues (Moore et Piel, 2000; Metsä-Ketelä *et al.*, 2002 et 2003).

### 3.1.6. Mode d'action

Peu d'informations sont disponibles sur le mécanisme d'action des angucyclines. Elles exercent leur cytotoxicité par différents mécanismes, par intercalation directe dans l'ADN et inhibition de la topoisomérase II, ou par le cycle d'oxydoréduction induisant la formation des formes réactives toxiques de l'oxygène ou encore par complexation calcium-dépendante avec la partie sucre des mannoprotéines de la paroi cellulaire, entraînant une perturbation de l'intégrité et de la fonction de la membrane cellulaire puis la mort de la cellule (Groll *et al.*, 1998; Loadman et Calabrese, 2001).

## 3.2. Les aminoglycosides

Les aminoglycosides représentent une grande classe d'antibiotiques très diversifiés, dont le premier composé, la streptomycine, fut isolé par Waksman en 1944, à partir d'une souche de *Streptomyces griseus* (in Umezawa et Hooper, 1982). Il fut rapidement mis en évidence que ces antibiotiques avaient une activité antibactérienne et furent utilisés avec succès en thérapeutique humaine dans le traitement de la tuberculose et d'autres infections sérieuses. Cependant, à la fin des années 50, après plusieurs années d'utilisation, des souches résistantes à la streptomycine sont apparues chez les patients. Le même phénomène s'est reproduit avec la kanamycine pendant la décennie suivante. Cela a stimulé la recherche de nouveaux aminoglycosides et de dérivés semi-synthétiques. Pendant les années 70, les efforts de recherche ont été récompensés avec la découverte de nouvelles molécules utilisables en thérapeutique humaine et vétérinaire (Stead, 2000).

Les premiers aminoglycosides naturels découverts (streptomycine, néomycine, kanamycine, tobramycine, gentamicine, sisomicine) ont servi de base pour l'élaboration de produits semi-synthétiques (amikacine, isépacine, nétilmicine), développés afin d'obtenir des molécules actives contre les bactéries devenues résistantes aux aminoglycosides naturels. La synthèse totale chimique de plusieurs aminoglycosides a été réalisée (Umezawa et Tsuchiya, 1982), mais la fermentation reste la voie la plus économique pour leur production (Stead, 2000).

Les aminoglycosides jouent un rôle important comme agents thérapeutiques. La gentamicine est actuellement l'aminoglycoside de choix pour le traitement d'infections sérieuses (Umezawa et Tsuchiya, 1982; Stead, 2000).

En vétérinaire et en agriculture, les aminoglycosides sont largement employés dans les entérites et ajoutés aux aliments comme moyens prophylactiques et promoteurs de croissance des animaux. Ceux-ci sont la gentamicine, la néomycine, la dihydrostreptomycine et la streptomycine, ainsi que l'apramycine, l'hygromycine B et la spectinomycine (Stead, 2000). La kasugamycine a été employée pendant plusieurs années au Japon pour la protection des récoltes notamment contre la maladie fongique du riz causée par *Pyricularia oryzae* (Stead, 2000).

### 3.2.1. Structure et Classification

Les aminoglycosides sont des molécules polaires et polycationiques. Leur structure de base commune comporte un aminocyclitol, auquel se lient par des ponts glycosidiques, deux ou exceptionnellement trois oses. Ces cycles peuvent porter des substituants dont les plus importants sont les groupes hydroxyles et les groupes basiques. Le cyclitol est dans la majorité des cas, la 2-déoxystreptamine, et parfois la streptidine (figure 11).

Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et semi-synthétiques. La figure 12 illustre quelques exemples d'aminoglycosides.

Les aminoglycosides naturels sont classés selon la nature du cyclitol et son mode de substitution (Stead, 2000).

les déoxystreptamines 4,5-disubstituées (néomycines, promomycine, ribostamycine et butirosine),

les déoxystreptamines 4,6-disubstituées (gentamicines, kanamycines, amikacine, sisomicine, nétilmicine et tobramycine).

la 4-déoxystreptamine 4-monosubstituée (l'apramycine).

la streptidine 4-monosubstituée (streptomycine).



Figure 11. Composés aminocyclitols des aminoglycosides (Stead, 2000).

### 3.2.2. Biosynthèse des aminoglycosides

Des expériences d'incorporation de molécules marquées ont montré que le glucose et la glucosamine sont les deux principaux précurseurs de la biosynthèse des aminoglycosides. L'assemblage des différentes sous-unités se fait par des liaisons  $\alpha$ -glycosidiques.

Pour illustrer les principales étapes de biosynthèse d'un aminoglycoside, la néomycine B produite par *Streptomyces fradiae* a été choisie (Okuda et Ito, 1982). Cet antibiotique est un tétrasaccharide qui contient, en plus de la désoxy-2-streptamine, deux diamino-sucres (les néosamines B et C) et une unité D-ribose.

La désoxy-2-streptamine est formée à partir du D-glucose. Le passage du sucre au cyclitol s'effectue par un intermédiaire énolique cyclique. Des groupements amines sont introduits séquentiellement via un dérivé cétonique. Un système multienzymatique, dont des

transaminases et des déshydrogénases, est responsable de la biosynthèse de cette sous-unité (figure 13).

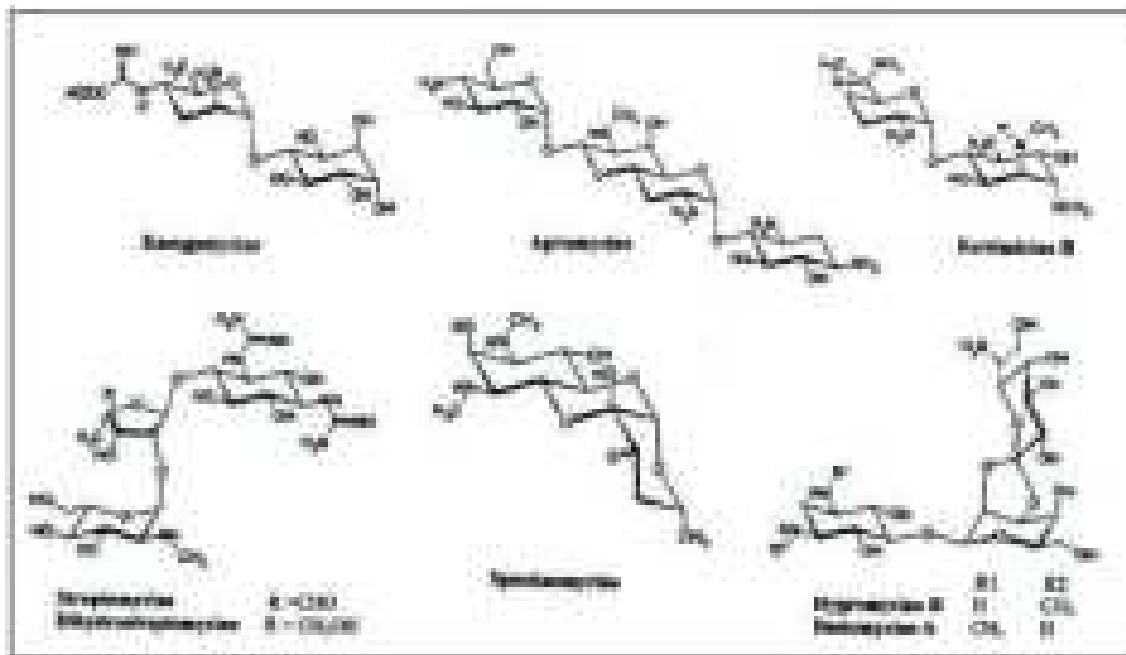
La bioconversion du glucose en néosamines B et C implique comme intermédiaire, la glucosamine (figure 14).

Le D-ribose est biosynthétisé à partir du D-glucose selon deux voies : celle des hexoses monophosphates et celle impliquant comme intermédiaire l'acide glucuronique.

L'assemblage des sous-unités constituant la néomycine B s'effectue par des liaisons glycosidiques.

### 3.2.3. Spectre d'action et toxicité

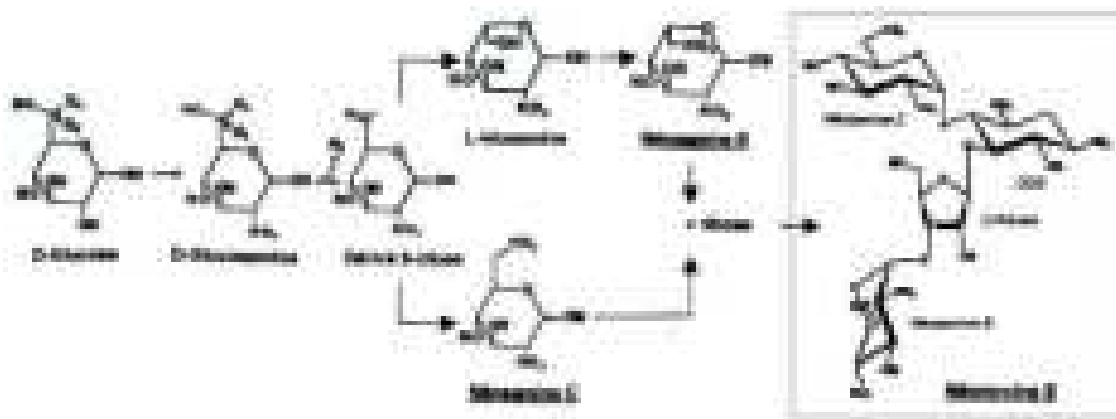
Le spectre d'action des aminosides est large, il s'étend sur les bacilles à Gram négatif aérobies notamment les entérobactéries et sur les bacilles à Gram positif (*Listeria*). Ils sont actifs contre les *Staphylococcus aureus* sécréteurs de pénicillinases, sur les cocci à Gram négatif, *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. Ces antibiotiques sont inactifs sur les streptocoques, les pneumocoques, les entérocoques et les anaérobies. La streptomycine est un



**Figure 12.** Structures de quelques aminoglycosides (Gonzalez et al., 1998; Stead, 2000).



**Figure 13.** Voie de biosynthèse de la désoxy-2-streptamine (Okuda et Ito, 1982).



**Figure 14.** Voie de biosynthèse des néosamines B et C (Okuda et Ito, 1982).

cas particulier; elle est active sur les mycobactéries et est donc réservée pour le traitement de la tuberculose. Certains aminoglycosides sont antifongiques, insecticides, antihelminthes, antiviraux (notamment contre le virus du sida; Cabrera *et al.*, 2002), anti-protozoaires ou antitumoraux (Berdy *et al.*, 1987).

Tous les aminoglycosides sont néphrotoxiques, ototoxiques (vestibulaire et auditif) et peuvent causer parfois un blocage neuromusculaire et des réactions d'hypersensibilité. Cette néphrotoxicité est généralement réversible, mais l'ototoxicité ne l'est pas (Gonzalez *et al.*, 1998).

### 3.2.4. Microorganismes producteurs

Les aminoglycosides sont généralement produits par les actinomycètes, particulièrement les genres *Streptomyces* et *Micromonospora*. Parmi les *Streptomyces* producteurs, on trouve *S. griseus* (streptomycine), *S. fradiae* (néomycines), *S. ribosidificus* (ribostamycine), *S. kanamyceticus* (kanamycines), *S. tenebrarius* (tobramycine, apramycine), *S. rimofaciens* (destomycine), *S. hygroscopicus* (hygromycine), *S. kasugaensis* (kasugamycine), *S. spectabilis* (spectinomycine) et *S. humidus* (dihydrostreptomycine). Les paromomycines I et II sont produites par différentes espèces de *Streptomyces*.

Les espèces de *Micromonospora* productrices d'aminoglycosides sont *M. purpurea*, *M. echinospora* et *M. sagamiensis* var. *nonreductans* (gentamicines), *M. inyoensis* (sisomicine) et *M. olivoasterospora* (fortimicines) (Stead, 2000).

### 3.2.5. Mode d'action des aminosides

Les aminoglycosides sont en grande majorité de puissants bactéricides (Kotra *et al.*, 2000). Ils inhibent la synthèse protéique, suite à leur fixation sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Des concentrations élevées provoquent une altération de la correspondance codon-anticodon. Le résultat est une lecture incorrecte de l'ARNm qui conduit une fausse liaison de l'ARNt au site accepteur sur le ribosome. La protéine produite a une séquence d'acides aminés incorrecte et donc défectueuse. Certains aminosides (ex. streptomycine) sont également actifs sur la membrane plasmique (Umezawa et Hooper, 1982; Wright *et al.*, 1998).

### 3.3. Les antibiotiques antifongiques

Contrairement aux antibiotiques antibactériens, la recherche de nouveaux antifongiques a progressé lentement (Gupte *et al.*, 2002). Les raisons sont dues au fait que les champignons soient eucaryotes, comme les cellules des mammifères et les agents qui inhibent la biosynthèse des protéines, de l'ARN ou de l'ADN d'un champignon sont également toxiques pour l'hôte (Georgopapadakou et Walsh, 1994). Actuellement, les critères recherchés dans les nouveaux antifongiques sont l'inhibition de la biosynthèse de la paroi, avec une puissance comparable à l'amphotéricine B, une sécurité comparable au fluconazole et une activité fongicide *in vitro* et *in vivo*.

### 3.3.1. Structure et classification

Les antibiotiques antifongiques présentent une large diversité structurale : lactones macrocycliques (nystatine), analogues des nucléosides (azoles et dérivés), diterpènes tétracycliques (sordarines), oligopeptides cycliques (pneumocandines),  $\beta$ -aminoacides (cispentacine), oligosaccharides (fusacandines), quinones (pradimycines), etc. Les structures de quelques antifongiques sont illustrées par la figure 15.

Les agents antifongiques ont une large application dans la médecine humaine et vétérinaire et dans l'agriculture (Vandamme, 1985). Cinq classes principales d'antifongiques systémiques sont actuellement utilisées en clinique : les polyènes, les dérivés azoles, les allylamines, les thiocarbamates et les analogues nucléosides (Georgopapadakou et Walsh, 1996).

Les antibiotiques antifongiques peuvent être classés selon leur mode d'action, leur site d'action ou leur origine. Dans la classification basée sur l'origine, nous distinguons deux grands groupes : les molécules naturelles élaborées par divers microorganismes et celles obtenues par synthèse chimique.

#### 3.3.1.1. Les antifongiques naturels

Les antifongiques naturels forment deux grands groupes se différenciant par la structure des molécules qu'ils renferment : les antifongiques de structure polyénique et ceux à structure non polyénique. Les actinomycètes et les champignons sont les principaux producteurs (Breton *et al.*, 1989).

##### 3.3.1.1.1. Les antifongiques polyéniques

Les antifongiques polyéniques sont des lactones macrocycliques constitués d'un cycle lactone possédant une partie hydrophile (6 à 14 fonctions hydroxyles) et un "squelette" carboné hydrophobe comportant 3 (triènes), 4 (tétraènes), 5 (pentaènes), 6 (hexaènes) ou 7 (heptaènes) doubles liaisons conjuguées. Les polyènes ont un spectre UV-visible caractéristique (tableau 6) avec 3 maxima d'absorption entre 260 et 405 nm (Martin, 1979; Dinya et Sztaricskai, 1986).

Les problèmes associés à la solubilité, la stabilité, l'absorption et la toxicité des polyènes font que parmi de nombreuses molécules décrites, très peu ont trouvé une application thérapeutique. L'amphotéricine B et la nystatine sont les plus utilisées (Drouhet et Dupont, 1987).

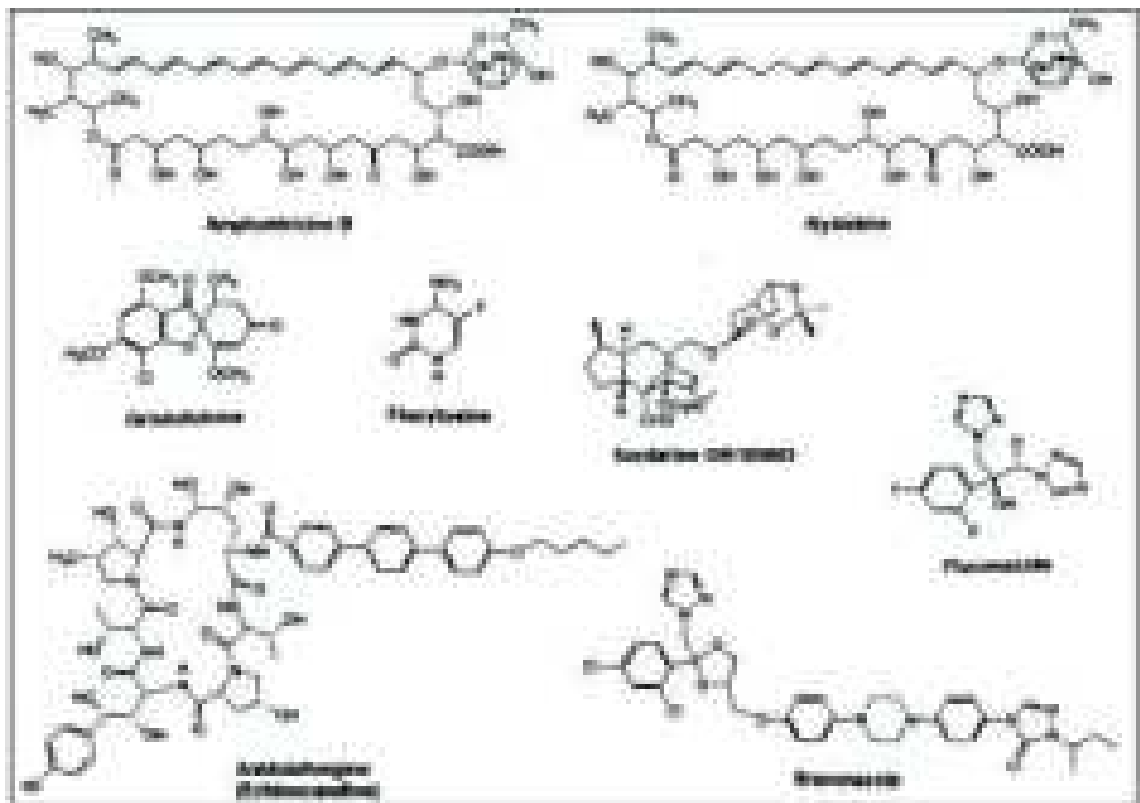


Figure 15. Structures de quelques antibiotiques antifongiques (Odds et al., 2003).

Types de Polyènes	Longueur d'onde (nm)			Exemples
	Premier pic	Deuxième pic	Troisième pic	
Triténes	283	272	262 ±2	Trichine
Tétraténes	318	304	291 ±2	Nystatine
Pentaténes	350	331	317	Escoridines
Méthylpentaténes	357	340	323	Falipine
Carboxypentaténes	364	Bande d'absorption étendue		Mycostine
Hexaténes	380	358	340 ±2	Candicazine
Carboxylhexaténes	385	Bande d'absorption étendue		Democetazine
Heptaténes	400	382	361 ±2	Amphotéricine B

Tableau 6. Maxima d'absorption en UV-visible des polyènes (Martin, 1979).

Les polyènes sont fongicides et ont le spectre d'activité antifongique le plus large de tous les agents cliniques disponibles (Andriole, 2000). Ce groupe comprend la nystatine, l'amphotéricine B et l'amphotéricine B liposomale (forme moins néphrotoxique préparée avec des liposomes à partir de l'amphotéricine B), la pimarine et d'autres.

### 3.3.1.1.2. Les antifongiques non polyéniques

Ces molécules, possédant des structures chimiques très variées peuvent appartenir aux groupes suivants : glucides (validamycine, kasugamycine), quinones (nanaomycines),



polypeptides (cyclosporine A), hétérocycles azotés (tunicamycine, blasticidine S, polyoxines), polyéthers (nigéricine, nonensine), composés alicycliques (cycloheximide) et composés aromatiques (griséofulvine).

Parmi les substances antifongiques non polyéniques commercialisées aujourd'hui, la griséofulvine joue un rôle important en chimiothérapie humaine (Drouhet, 1978). Peu toxique, elle est bien tolérée dans la majorité des cas. Les effets secondaires (troubles hépatiques, vertiges, asthénies) sont rares et n'apparaissent qu'au cours de traitements prolongés.

Les échinocandines et les pneumocandines sont respectivement des antifongiques lipopeptides et hexapeptides cycliques ayant une excellente activité *in vitro* et *in vivo* contre *Candida* et *Aspergillus* et permettent d'améliorer la survie dans le cas d'aspergillose envahissante (Groll *et al.*, 1998; Andriole, 1998; 1999; 2000).

Les pradimicines-bénanomicines sont des quinones naphtacènes à activité fongicide dirigée contre plusieurs champignons, même les isolats résistants à d'autres agents antifongiques. (Andriole, 1998; 2000).

Les sordarines ont une activité *in vitro* contre *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *C. neoformans*, *P. carinii* et quelques champignons filamenteux (Andriole, 1999; 2000).

### 3.3.1.2. Les molécules de synthèse chimique

Parmi les nombreuses préparations utilisables dans le traitement des mycoses superficielles ou profondes, plusieurs molécules de synthèse sont actuellement employées en thérapie humaine et vétérinaire pour leur activité et leur moindre toxicité.

Nous distinguons ainsi :

**Les analogues des nucléosides** : Cette classe d'antifongiques englobe la flucytosine et les divers azoles tels que le clotrimazole, le ketoconazole, le fluconazole et l'itraconazole. Leur spectre d'action très large concerne pratiquement tous les champignons. L'activité antifongique et l'efficacité clinique des azoles varient avec chaque composé (Andriole, 2000).

**Les allylamines et les thiocarbamates** : Ce sont des agents fongicides synthétiques qui inhibent la squalène époxidase, une enzyme qui convertit le squalène en lanostérol (Groll *et al.*, 1998; Andriole, 2000). Il existe deux allylamines antifongiques, la naftifine et la terbinafine (Goad *et al.*, 1985) et un seul thiocarbamate, la talnaftate (Kobayashi et Medoff, 1977). Leur activité contre les dermatophytes, les levures et les moisissures rend leur intérêt non négligeable.

**Les peptides cationiques** : Il existe des peptides cationiques naturels (cécropines, dermaseptines, etc.) et des peptides cationiques synthétiques (Groll *et al.*, 1998; Andriole, 1999). La dolastatine 10, antifongique synthétique a une activité fongicide puissante contre *C. neoformans* (Andriole, 1999).

### 3.3.2. Microorganismes producteurs

Les antibiotiques antifongiques sont produits généralement par les champignons et les bactéries. Parmi les champignons producteurs, on trouve *Penicillium griseofulvum* et *P. patulum* (griséofulvine), *Sordaria araneosa*, *Graphium putredinis*, *Penicillium minioluteum* (sordarines et leurs analogues), *Aureobasidium pullulans* (auréobasidine A), *Coryneum modonium* (corynécandine), *Phialophora cyclaminis* (classe papulacandine), *Fusarium*

*sambucinum* (fusacandine), *Fusarium* sp. K432, (Fusarieline A), *Arthrinium phaeospermum* (arthrichitine), *Zalerion arboricola* (pneumocandine) et *Trichoderma viride* (tricholine).

Parmi les bactéries non mycéliennes, on trouve *Bacillus cereus* (cispentacine, azoxybacilline) et *Pseudomonas* sp. (pyochéline), *Haliangium luteum*, myxobactérie marine (haliangicine), *Sorangium cellulosum*, une *Myxococcale* (soraphen),

Parmi les actinomycètes producteurs, nous citerons principalement les genres *Streptomyces* (plusieurs souches et espèces), *Streptoverticillium* (HA-94, un pentaène), *Streptosporangium* sp. SCC1786 (pradimicines, sinéfungines et dehydrosinéfungines), *Micromonospora* sp. (Rustmicine ou galbonolide A et galbonolide B) et *Actinomadura* (pradimicines et bénanomycines).

### 3.3.3. Mode d'action des antifongiques

Les antifongiques agissent par altération des fonctions de la membrane, de l'ADN et des ribosomes ainsi que par inhibition de la synthèse de la paroi, de l'ergostérol et de la synthèse protéique (Jones *et al.*, 1990; Iwasaki, 1993; Chen *et al.*, 1994).

#### 3.3.3.1. Inhibiteurs de la synthèse de la paroi

La chitine, composant de la paroi fongique, est synthétisée essentiellement par des chitine-synthases. Les nikkomycines et les polyoxines sont des peptides-nucléosides de structure analogue au substrat UDP-N-acétylglucosamine, composant essentiel dans la biosynthèse de la chitine (Georgopapadakou et Tkacz, 1995).

Les étapes dans la biosynthèse du polymère glucane de la paroi fongique, ont été bien étudiées (Cabib *et al.* 1988; Tkacz, 1992; Georgopapadakou et Tkacz, 1995). Divers lipopeptides et lipopolysaccharides naturels, tels que les échinocandines, les pneumocandines, les papulacandines et les bénanomycines inhibent les glucane synthases et la synthèse de glucane dans l'ensemble de la cellule fongique (Roy *et al.*, 1987; Takeuchi *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1989; Schmatz *et al.*, 1992; Kurtz et Douglas, 1997). La 1,3-D-glucane synthase, une enzyme absente des cellules des mammifères constitue une cible idéale pour les échinocandines (Fostel et Lartey, 2000).

#### 3.3.3.2. Action sur la membrane plasmique

Les mannoprotéines constituent presque 50% des hydrates de carbone de la membrane fongique et représentent une cible potentielle pour les bénanomycines et pradimicines (Wills *et al.*, 2000). Celles-ci agissent par complexation de leur groupe carboxyle libre avec la partie saccharide des mannoprotéines superficielles, suivie par l'action sur la membrane, causant la fuite du potassium intracellulaire (Sawada *et al.*, 1990; Ueki *et al.*, 1993).

Comme chez les mammifères, la membrane cellulaire fongique contient des stérols et des phospholipides comme composants lipidiques principaux déterminant sa fluidité. Celle-ci est un facteur clé pour ses fonctions de barrière (Georgopapadakou et Walsh, 1996; Wills *et al.*, 2000). Dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, interviennent l'oxidosqualène cyclase et la C24-méthyl-transférase. Cette dernière n'a aucun homologue mammalien (le cholestérol n'est pas méthylé en C-24) et constitue ainsi une cible particulière (Oehlschlager et Czyzewska, 1992; Georgopapadakou et Walsh, 1996).

Les macrolides polyéniques agissent également sur la membrane plasmique, en se complexant avec les stérols. Cette interaction polyènes-stérols entraîne une perturbation

de la perméabilité membranaire, ce qui a pour conséquence la fuite des éléments intracellulaires indispensables au métabolisme normal de la cellule. Cette fuite provoque aussi une acidification du milieu cellulaire qui active les enzymes autolytiques et provoque la lyse complète de la cellule fongique (Michel-Briand, 1981). Les grosses molécules (amphotéricine B) créent des pores; les plus petites (filipine, pimaricine) forment des inclusions entre les deux couches phospholipidiques de la membrane (Gale *et al.*, 1981; Kerridge, 1986).

Le mode d'action des composés azoles se situe essentiellement au niveau de la membrane fongique où ils bloquent la synthèse de l'ergostérol en inhibant la cytochrome P450 3A-dépendant C14-déméthylase, enzyme responsable de la conversion du lanostérol en ergostérol (Borgers, 1980; Kerridge, 1986). À des concentrations plus élevées, une destruction physique de la membrane plasmique est responsable de l'effet fongicide.

Les allylamines (naftifine et terbinafine) inhibent de manière réversible et non compétitive, la squalène époxidase, une enzyme qui en présence de la squalène cyclase, convertit le squalène en lanostérol et finit par inhiber la conversion du lanostérol en ergostérol (Groll *et al.*, 1998; Andriole, 2000).

### **3.3.3.3. Inhibiteurs sélectifs de la synthèse des protéines et des acides aminés**

La blastidicine S inhibe la synthèse des protéines en bloquant l'incorporation des acides aminés. La kasugamycine arrête l'inhibition des chaînes polypeptidiques en se fixant sur la sous-unité 40S des ribosomes (Gale *et al.*, 1981). Le cycloheximide en se fixant sur la sous-unité ribosomale 60 S, bloque la translocation des ribosomes sur l'ARN messager (Kerridge, 1986).

Les sordarines, la cispentacine et l'azoxybaciline sont aussi des inhibiteurs de la synthèse des protéines et des acides aminés (Fujiu *et al.*, 1994).

### **3.3.3.4. Inhibiteurs de la biosynthèse des sphingolipides**

Les sphingolipides sont des cibles potentielles pour la rustmicine (galbonolide A) et le galbonolide B, la khafrefungine, les spinofungines, les folimycines, les bafilomycines, l'auréobasidine, la myriocine et la lipoxamycine (Gupte *et al.*, 2002).

### **3.3.3.5. Inhibiteurs du transport d'électrons**

L'haliangicine inhibe spécifiquement le transport d'électrons dans le complexe III de la chaîne respiratoire. D'autres inhibiteurs comme les myxothiazoles, les melithiazoles et les cystothiazoles sont connus (Fudou *et al.*, 2001a,b).

### **3.3.3.6. Autres inhibiteurs**

La griséofulvine, est un inhibiteur de la division nucléaire. Elle agirait au niveau des microtubules (Huber et Tietz, 1984), directement sur les dimères de tubulines (Kerridge, 1986; Odds *et al.*, 2003). La dolastatine 10, peptide cationique, est un composé synthétique qui vise également les tubulines intracellulaires et inhibe l'assemblage des microtubules et la fixation de la GTP tubuline-dépendante (Andriole, 2000; Fostel et Lartey, 2000; Odds *et al.*, 2003).

La fluoro-5-cytosine est un antimétabolite de la cytosine, avec laquelle elle entre en compétition. Elle est convertie en fluoro-5-uracile (cytosine désaminase) puis métabolisée en un certain nombre de dérivés qui exercent leur effet inhibiteur soit au niveau de l'ADN, soit des ARN (Kerridge et Whelan, 1984). Ainsi la fluoro-5-désoxyuridine monophosphate (F5dUMP) bloque la synthèse de l'ADN par inhibition de la thymidylate synthétase. La fluoro-5-uridine triphosphate (F5UTP) inhibe la synthèse des protéines en s'incorporant au niveau de l'ARN fongique (Kerridge, 1986).

### 3.3.4. Recherche de nouvelles molécules antifongiques naturelles et synthétiques

L'incidence accrue des infections fongiques chez les patients immunodéprimés, l'évolution constante de leur épidémiologie, le développement de la résistance aux antifongiques, le nombre réduit d'antifongiques utilisables en thérapeutique et la toxicité de certains d'entre eux ont initié de nouvelles stratégies de recherche de molécules antifongiques innovantes. Les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis une meilleure compréhension des voies essentielles de la croissance de la cellule fongique et sa multiplication.

Différentes stratégies de recherche sont en cours d'exploitation (Fostel et Lartey, 2000; Mallié et Batisde, 2001; Gupte *et al.*, 2002). Nous citerons :

1. Celle qui consiste à créer de nouvelles molécules dérivées d'antifongiques connus en s'appuyant notamment sur les relations structure-activité. Le meilleur exemple est celui des triazoles dont certains dérivés sont en cours d'essais cliniques tels que le posaconazole, le ravuconazole ou le voriconazole (Mallié et Bastide, 2001). D'autres exemples incluent les carbazoles dications-substitués, les furanes et les benzimidazoles. Les échinocandines inhibent la synthèse du  $\beta$ -1,3-glucane fongique et cela représente la première nouvelle cible en 20 ans de recherche de médicaments antifongiques cliniquement utiles.

2. La deuxième stratégie cherche à mettre en évidence des cibles moléculaires spécifiques des champignons et non retrouvées chez l'hôte comme la biosynthèse des glucanes, des mannanes ou de la chitine. Cette voie a généré des dérivés semi-synthétiques d'antibiotiques antifongiques tels que les échinocandines (cilofungine, versicor ou V-Candin®), les pneumocandines (caspofungine ou Cancidas®, les bénanomycines, les pradimicines ou les nikkomycines.

3. La troisième utilise des préparations originales à base de liposomes, de cyclodextrines, de cochléates ou de nanoparticules susceptibles d'améliorer la biodisponibilité tout en assurant sa moindre toxicité.

4. D'autres stratégies de recherche telle que l'utilisation de facteurs de virulence du champignon comme cible d'action voient déjà le jour. Il est évident que l'aspartyl protéinase de *Candida* (CAP) participe dans sa virulence. Le rôle de cette protéinase dans la pathogénicité apparaît chez les mutants de *C. albicans* déficients en aspartyl protéinase et qui sont significativement moins mortels que la souche type sauvage. Ainsi, la CAP est une autre cible pour les antifongiques contre *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, etc. (Ross *et al.*, 1990; Homma *et al.*, 1993).

5. Enfin, l'association de ces antifongiques nouveaux aux molécules existantes pourrait améliorer leur efficacité.

---

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## I. ISOLEMENT SÉLECTIF DES STREPTOSPORANGIACEAE À SPORANGES

Les *Streptosporangiaceae* à sporanges représentés par les genres *Planomonospora*, *Planobispora*, *Planotetraspora* et *Streptosporangium*, sont isolés à partir de divers sols dans le monde en utilisant différentes méthodes sélectives car ils ne constituent qu'une faible proportion de la population actinomycétale. Ainsi, le traitement des échantillons de sol à la chaleur sèche à 100 ou 120°C suivi de dilutions étalées sur des milieux de culture sélectifs permet de les isoler en quantités appréciables. Des agents chimiques tels certains antibiotiques sont également ajoutés au milieu de culture afin de réduire le nombre de bactéries non mycéliennes ayant résisté au traitement thermique (Hayakawa *et al.*, 1991a, b et 1997).

### 1. Origine et caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol

---

#### 1.1. Origine des échantillons de sols

L'isolement des souches est réalisé à partir de 30 échantillons de sols provenant de différentes régions sahariennes et de M'Sila (annexe 1). Les prélèvements ont été effectués aseptiquement, loin de toute influence racinaire et en surface (vingt premiers centimètres), à l'exception du sol GS2 qui a été prélevé à une profondeur de 60 cm.

Vingt deux échantillons ont été prélevés au niveau de cinq palmeraies dont :

- Deux de la palmeraie d'Adrar (notés AD1 et AD2) et plus précisément de la station expérimentale de l'I.N.R.A.

- Huit de Béni-Abbès, dont sept proviennent de la palmeraie (BA1, BA2, BA4, BA5, BA6, BA7 et BA8) et le huitième (BA3), du jardin botanique de l'Unité de Recherche sur les Zones Arides (U.R.Z.A., U.S.T.H.B.).

- Un de la palmeraie de Bouda (TB4), située à 15 km au Nord d'Adrar, au niveau d'une parcelle sévèrement touchée par le bayoud.

- Sept de la palmeraie de Tolga : TL1 et TL2 (station de Aïn-Ben-Naoui), TL3 et TL4 (Bouchagroun), TL5 et TL6 (Tolga centre) et enfin, TL7 (Sidi-Mahdi).

- Quatre de la palmeraie de Touggourt : TG1, TG2, TG3 et TG4.

Quatre échantillons proviennent du Hoggar. HG1 et HG5 sont prélevés de jardins (Tamanrasset centre pour HG1 et à 12 km à l'Est de cette ville pour HG5). HG2 est prélevé d'alluvions (lieu situé à 6 km à l'Est de HG5). HG3 est issu d'un gisement d'étain et de tungstène (20 km au sud de Tamanrasset).

Deux échantillons, MS1 et MS2, sont issus d'une plaine aride située au nord de M'Sila.

---

Deux échantillons, GS1 et GS2, sont originaires de Gassi-Touil (sud de Ouargla), précisément au niveau d'un reg faisant partie du périmètre de la base-vie de la Sonatrach.

### 1.2. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les analyses physico-chimiques ont été effectuées par Bennadji A., Habila A. et Guemat M. (U.R.Z.A., Alger). Les résultats (annexe 1) ont montré que les sols sont alcalins (pH : 7,6 à 8,9) et à texture variable (sableuse à limono-argileuse). Les valeurs obtenues pour la conductivité électrique indiquent que les sols de Béni-Abbès, de Bouda, du Hoggar ainsi que AD1, MS2 et GS1 ne sont pas salés ; AD2, TG2, TG4, MS1 et GS2 sont moyennement salés, tandis que les 7 autres échantillons de Tolga sont très salés. Le pourcentage en calcaire est nul dans les sols du Hoggar et faible à moyen pour les autres échantillons. Les taux de carbone les plus faibles sont trouvés dans les échantillons de Touggourt.

## 2. Méthodes d'isolement

---

### 2.1. Prétraitement des échantillons de sol

Le traitement des échantillons de sol à la chaleur sèche, préconisé par Nonomura et Ohara (1969a) est basé sur la résistance des spores des actinomycètes à la dessiccation. Ceci permet de réduire considérablement le nombre des autres bactéries indésirables sur les milieux d'isolement. Pour chaque échantillon, environ 2 g de sol sec sont mis dans des boîtes de Pétri stériles et placés au four à 120°C pendant 1 h. Les échantillons de sol sont analysés après refroidissement à température ambiante.

### 2.2. Méthode d'isolement

Les *Streptosporangiaceae* sont isolés à partir des échantillons de sol par la méthode des suspensions-dilutions. Ainsi, 1 g de sol sec, traité ou non à la chaleur, est suspendu dans 10 mL d'eau distillée stérile, ce qui représente la dilution  $10^{-1}$ . Après agitation au vortex, des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-4}$  sont réalisées. Des aliquotes de 0,1 mL de chaque dilution sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu d'isolement. Trois essais sont effectués par dilution. Les boîtesensemencées sont incubées à 30°C et examinées régulièrement à partir du 7<sup>ème</sup> jour jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour ou plus, en raison notamment, de la croissance parfois assez lente des *Streptosporangiaceae*.

### 2.3. Milieux de culture sélectifs

Trois milieux de culture préconisés dans la littérature pour l'isolement sélectif des actinomycètes rares ont été d'abord testés pour l'analyse de deux sols, AD1 (Adrar) et BA6 (Béni-Abbès). Ce sont les milieux "chitine-vitamines B-agar" et "acides humiques-vitamines B-agar" (Hayakawa et Nonomura, 1987) et "charbon-vitamines B-agar" (You et Park, 1996). Ces trois milieux sont additionnés d'un antibiotique antibactérien, l'acide nalidixique, à raison de 20 µg/mL (Hayakawa *et al.*, 1991b) et d'un antifongique, le cycloheximide à raison de 50 µg/mL. La composition de ces milieux est donnée en annexe 2.

Par la suite, le meilleur milieu est sélectionné et utilisé pour analyser les 30 échantillons de sol. Il est additionné de 11 antibiotiques antibactériens pris un à un, à des concentrations

précises. Ce sont : la cyclosérine, l'érythromycine, la gentamicine, la novobiocine et la streptomycine (10 mg/L pour chacun), le chloramphénicol, la kanamycine, l'oxytétracycline, la polymyxine, la pénicilline (25 mg/L pour chacun), et la rifampicine (5 mg/L). Le choix des antibiotiques et des concentrations est basé sur les bons résultats obtenus par l'équipe de Microbiologie de l'ENS de Kouba sur la sélection des actinomycètes rares (Boudjella, 1994; Bouti, 1997).

### 3. Reconnaissance des isolats

---

Toutes les colonies qui apparaissent à la surface du milieu d'isolement sont systématiquement observées au microscope optique (Zeiss) aux grossissements 10  $\times$  10 et 10  $\times$  40, afin de sélectionner celles qui présentent les caractéristiques micromorphologiques des *Streptosporangium*. Les isolats du genre *Streptosporangium* sont facilement reconnaissables par leur mycélium du substrat stérile et non fragmenté, surmonté d'un mycélium aérien produisant des sporanges globuleux contenant chacun une seule chaîne spiralée de spores non mobiles, rondes à ovoïdes ou plus rarement en bâtonnets droits.

### 4. Purification et conservation

---

Les colonies sélectionnés sont prélevées délicatement à l'aide d'une pointe stérile puis purifiées par stries sur milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966), à base de glucose, d'extrait de malt et de levure (annexe 2). Les isolats purifiés sont ensemencés sur le même milieu coulé en tubes inclinés. Ces derniers sont incubés à 30°C pendant 14 à 28 jours, puis conservés à 4°C. Le milieu ISP2 est choisi car il permet une croissance et une sporulation relativement bonnes de nos souches.

## II. DÉTERMINATION DES ISOLATS DE *STREPTOSPORANGIUM*

### 1. Etude morphologique

---

L'étude morphologique est basée sur les caractéristiques culturales (croissance, couleur des mycélia aérien et du substrat, ainsi que celle des pigments solubles) et micromorphologiques (forme et taille des sporanges et des spores).

#### 1.1. Caractéristiques culturales

Les caractéristiques culturales des colonies sont notées sur les milieux de culture ISP2, ISP3, ISP4, ISP6, ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966) et OYG (Nonomura, 1989). La composition des milieux est donnée en annexe 2. Les couleurs des mycélia aérien et du substrat sont définies à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC-NBS).

## 1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Les isolats sont observés sur les différents milieux cités précédemment, à l'aide d'un microscope optique Zeiss à deux grossissements (100 et 400). Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce, pour étudier les mycéliums en place sans altérer leur structure.

Pour les milieux permettant une bonne sporulation, les observations sont également faites entre lame et lamelle, aux forts grossissements (400 et 1000) pour une bonne observation des sporanges et des spores (taille, forme, etc.).

Des micrographies sont prises à partir d'une observation au microscope électronique à balayage (modèle Cambridge Stereocan 240) pour trois isolats de *Streptosporangium* (Sg3, Sg163 et Sg10). Elles ont été réalisées par le Professeur L. Marchal de la Faculté de Médecine de Nancy (France).

La souche est cultivée sur milieu ISP2 ou chitine-vitamines B en boîtes de Pétri pendant 14 jours (jusqu'à avoir une bonne sporulation). Un carré de gélose (1 cm<sup>2</sup> environ) est découpé et placé dans un flacon hermétiquement fermé où il est exposé à la vapeur d'une solution de tétraoxyde d'osmium à 1% pendant 3 jours. Après rinçage à l'eau distillée, l'échantillon est déshydraté avec des concentrations croissantes d'alcool éthylique (30, 50, 70, 80 et 100%) puis séché. Il est ensuite placé sur un porte-objet et métallisé à l'or sous vide.

## 2. Etude chimique

---

Elle consiste à déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique et la présence ou non de glycine au niveau de la paroi cellulaire ainsi que la composition cellulaire en sucres et le type de phospholipides membranaires.

L'étude chimique des constituants cellulaires permet de confirmer l'appartenance des isolats au genre *Streptosporangium*. En effet, ce dernier ressemble morphologiquement au genre *Kutzneria* (dont les espèces étaient classées auparavant parmi les *Streptosporangium*), mais une étude chimio-taxonomique permet la distinction entre ces deux genres.

### 2.1. Obtention de la biomasse

Les isolats sont ensemencés en milieu ISP2 agité (140 rpm) et incubés à 30°C pendant 10 jours. Le mycélium est récupéré par filtration, lavé plusieurs fois à l'eau distillée puis séché à 30°C.

### 2.2. Détermination des acides aminés pariétaux

Il s'agit de déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) et de noter la présence ou non de la glycine. La méthode utilisée est celle de Becker *et al.* (1964). Dix milligrammes de mycélium sec de chaque isolat d'actinomycètes sont hydrolysés pendant 18 h à 100°C, par 1 ml d'acide chlorhydrique 6N dans des tubes à vis hermétiquement fermés. Les hydrolysats sont filtrés sur membrane en verre puis concentrés à sec dans un bain de sable chaud. Chaque résidu est lavé 3 à 4 fois à l'eau distillée (3 mL) jusqu'à élimination complète de l'HCl. Le résidu sec est repris finalement dans 0.3 ml d'eau distillée puis analysé par chromatographie.



Les acides aminés pariétaux sont déterminés par chromatographie descendante sur papier et à front perdu dans le système de solvant méthanol-eau distillée-acide chlorhydrique-pyridine (8 / 17,5 / 2,5 / 10, en volumes). Quinze microlitres de chaque hydrolysats sont déposés sur du papier Whatman n° 1 (60 x 50 cm) ainsi que 10 µL de chacun des deux échantillons témoins, une solution aqueuse de glycine (0,2% w/v) et le DAP (Fluka) à 0,01 M contenant les deux isomères LL et DL. Après 18 h de développement, le papier est séché à température ambiante puis révélé avec 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 au jaune vif. La forme LL migre plus vite que la forme DL. La glycine apparaît de couleur violette et migre plus rapidement que les isomères de DAP.

### 2.3. Détermination des sucres

Cinquante milligrammes de mycélium sec sont hydrolysés par 1 mL d'acide sulfurique 1N dans des tubes scellés, à 100°C pendant 2 h. L'acide est neutralisé avec une solution saturée d'hydroxyde de baryum jusqu'à obtention d'un pH neutre. Le précipité blanc obtenu est éliminé par centrifugation pendant 20 min. Le surnageant limpide est concentré à sec et le résidu final obtenu est dissout dans 0,3 mL d'eau distillée puis analysé par chromatographie.

Les hydrolysats sont analysés par chromatographie descendante sur papier selon la méthode de Lechevalier et Lechevalier (1970b). Vingt microlitres de chaque hydrolysats sont déposés sur papier Whatman n° 1, de même que 15 µL de solutions aqueuses standards des sucres suivants : arabinose, galactose, glucose, mannose, ribose, rhamnose et xylose (0,1% w/v). Le chromatogramme est développé durant 36 h dans un système de solvant composé par la partie supérieure d'un mélange de *n*-butanol-eau distillée-pyridine-toluène (5 / 3 / 3 / 4, v/v), puis séché à température ambiante avant d'être révélé par une solution acide de phtalate d'aniline. Après chauffage à 100°C pendant 5 min, les hexoses apparaissent en brun et les pentoses en rose. Le madurose (ou 3-O-methylgalactose) n'a pu être utilisé comme témoin (non commercialisé). Il a été identifié grâce à son Rf (0,8) par rapport au ribose et à sa couleur brune, tel que l'ont signalé Lechevalier et Lechevalier (1970b).

### 2.4. Identification des phospholipides membranaires

Le genre *Streptosporangium* possède le type PIV de phospholipides, c'est-à-dire, de la phosphatidyléthanolamine (PE) et des phospholipides contenant de la glucosamine (PG). La chromatographie sur couche mince de gel de silice est dans ce cas utilisée (Minnikin *et al.*, 1977). Le système de solvant est un mélange de chloroforme-méthanol-eau distillée (65 / 25 / 4, v/v). Dix microlitres de chaque échantillon sont spotés en double dans deux plaques différentes. Une des plaques est révélée par une solution d'anisaldéhyde pour la détection des PG, et l'autre, par une solution de ninhydrine pour la détection des PE (annexe 4). Les plaques sont par la suite chauffées à 100°C pendant 5 min. La PE apparaît de couleur rose violacé (Rf 0,5) et les PG vert-olive sombre (généralement 2 à 4 taches dont le Rf est compris entre 0,4 et 0,8).

## 3. Étude physiologique

Au total, 75 tests physiologiques utilisés habituellement par les taxonomistes pour l'identification des espèces d'actinomycètes en général et celles du genre *Streptosporangium* en particulier (Nonomura, 1989 ; Holt *et al.*, 1994) sont considérés dans cette étude. Ces tests sont cités ci-après et les méthodes sont détaillées en annexe 2.

### 3.1. Tests de dégradation de divers composés organiques

Cette étude est réalisée sur le milieu de base gélosé C1 préconisé par Nonomura et Ohara (1969b) spécialement pour les *Streptosporangium*, ainsi que sur les milieux Czapeck (Rapilly, 1968) et « bacto-yeast-nitrogen-base (Goodfellow, 1971).

Les tests sont les suivants :

- Dégradation de 23 glucides et dérivés; adonitol, arabinose, cellobiose, dextrine, dulcitol, érythritol, fructose, galactose, glycérol, inositol, lactose, maltose, mannitol, mélibiose, mélézitose,  $\alpha$ -méthyl-D-glucoside, ribose, raffinose, rhamnose, saccharose, sorbitol, tréhalose et xylose.

- Hydrolyse de l'amidon, de l'arbutine, de l'esculine et de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987), de l'adénine, de la caséine du lait, de la guanine, de l'hypoxanthine, de la tyrosine et de la xanthine (Gordon *et al.*, 1974), de la testostérone (Goodfellow, 1971) et du tween 80 (Sierra, 1957).

- Utilisation des sels de sodium : acétate, benzoate, butyrate, citrate, oxalate, propionate, pyruvate, succinate et tartrate (Gordon *et al.*, 1974).

### 3.2. Production de pigments mélanoides et de nitrate réductase

La mise en évidence des pigments mélanoides est possible sur les milieux gélosés ISP6 et ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966). Celle de la nitrate réductase est effectuée sur bouillon nitrate (Marchal et Bourdon, 1987).

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

Les tests sont les suivants :

- La croissance à pH 5 et pH 9 (sur GYEA liquide) et à la température de 42°C (sur ISP2).

- La sensibilité aux antibiotiques (sur ISP2) suivants : le chloramphénicol, la kanamycine, l'oxytétracycline et la pénicilline à raison de 25 mg/L pour chacun, la cyclosérine, l'érythromycine, la novobiocine et la streptomycine à 10 mg/L, la gentamicine, la rifampicine et la vancomycine à 5 mg/L (Athalye *et al.*, 1985).

- La sensibilité (sur GYEA) au phénol (0,005%), au tellurite de potassium (0,01% et 0,05%), au chlorure de sodium (1, 2, 3, 5 et 7%), au crystal violet (0,001 %), à l'azide de sodium (à 0,001 % et 0,01 %) et au lysozyme (0,005%). Ce dernier test est effectué sur milieu à base de glycérol de Gordon et Barnett (1977).

## 4. Etude moléculaire

---

---

Cette étude est basée sur l'extraction et l'amplification par PCR de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (= ADNr 16S) et la détermination de sa séquence. Une fois déterminée, cette dernière est comparée avec celles des espèces de référence.

#### 4.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est obtenu à partir d'une culture agitée de la souche de *Streptosporangium* dans 100 mL de milieu ISP2 (en Erlenmeyer) à 30°C pendant 5 jours. La culture est centrifugée puis le mycélium est lavé deux fois à l'eau bi-distillée et récupéré. Le mycélium peut être immédiatement utilisé pour l'extraction de l'ADN ou bien conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

La méthode utilisée pour l'extraction de l'ADN est celle de Liuet *al.* (2000).

**1-** Dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL, mettre 500 µL 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%.

**2-** Ajouter en dispersant une petite quantité de mycélium à l'aide d'une spatule ou d'un cure-dent stérile.

Laisser pendant 10 min à température ambiante.

**3-** Ajouter 150 µL d'une solution (pH 4,8) composée de 60 mL d'acétate de potassium 5 M, 11,5 µL d'acide acétique glacial et 28,5 µL d'eau distillée (le pH final de cette solution est de 4,8).

Vortexer brièvement et centrifuger à 10 000 rpm pendant 1 min.

**4-** Transvaser le surnageant dans un autre tube Eppendorf et centrifuger comme précédemment.

**5-** Transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf, ajouter un volume égal d'isopropanol.

Mélanger le tube brièvement par inversion, puis centrifuger à 10 000 rpm pendant 2 min.

Éliminer le surnageant.

**6-** Laver l'ADN avec 300 µL d'éthanol à 70%.

Centrifuger à 10 000 rpm pendant 1 min. Éliminer le surnageant et sécher le culot (l'ADN) à l'air.

**7-** Re-suspendre le culot dans 50 µL d'eau bidistillée stérile.

#### 4.2. Quantification de l'ADN

Pour contrôler la pureté de l'ADN, l'échantillon d'ADN est dilué 200 fois dans du tampon TE, puis sa densité optique (DO) est mesurée au spectrophotomètre, à deux longueurs d'ondes différentes.

260 nm: longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques, ADN et ARN.

280 nm: longueur d'onde d'absorption des protéines.

Si le rapport des DO :  $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}} \leq 1,8$  contamination par des protéines.

$\geq 2,0$  contamination par des ARN.

Le calcul de la quantité d'ADN nous est donné par la formule suivante:

$[ADN] = DO_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{facteur de dilution} (\mu\text{g} / \text{mL})$ .

Remarque : 1 unité  $DO_{260\text{ nm}} = 50 \mu\text{g/mL}$  d'ADN.

### 4.3. Electrophorèse en gel d'agarose

Le produit PCR est détecté et sa taille déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET) et visualisé par la fluorescence UV.

Le gel est préparé avec 0,8% d'agarose en poudre (DNA grade, Euromedex) dans un tampon TAE 1X (Tris-Acétate, EDTA) (Euromedex). L'ensemble est porté à ébullition pour faire fondre l'agarose. Le gel est ensuite laissé refroidir sans se solidifier pour pouvoir ajouter 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de BET (Sigma). Avant de couler le gel, un peigne est placé dans la cuve à électrophorèse. Il ne sera enlevé qu'après solidification du gel et servira à former des puits dans lesquels seront déposés les échantillons.

Le gel horizontal est recouvert du tampon de migration TAE 1X. Chaque échantillon d'ADN sera déposé dans un des puits du gel immergé dans le tampon. Pour que l'échantillon tombe au fond du puits, il sera alourdi avec un tampon de charge contenant 0,25% de bleu de bromophénol (Fisher Scientific Labosi), servant de marqueur de mobilité et 40% (w/v) de saccharose (Fisher Scientific Labosi) dissout dans de l'eau.

Pour estimer la taille de nos échantillons après électrophorèse, un marqueur de taille *IKb DNA Ladder* (Promega), préparé selon les recommandations du fournisseur (1 volume de *blue/orange 6X Loading Dye* pour 5 volumes de solution *DNA Ladder*) est déposé dans un puits de manière à le faire migrer de la même manière que nos échantillons. Ce marqueur de taille contient en fait différents fragments d'ADN de tailles connues qui serviront de référence pour estimer la taille de nos échantillons. La migration se fait en 30 min à 50 V.

La visualisation des bandes d'ADN est possible grâce au bromure d'éthidium incorporé dans le gel lors de sa préparation. C'est un agent mutagène qui s'intercale entre les acides nucléiques et fluoresce sous lumière UV à 254 nm. Après migration des échantillons, le gel est déposé sur un transilluminateur (table UV). Les bandes d'ADN sont alors visibles et une photographie peut être prise avec un polaroid.

### 4.4. Amplification par PCR

L'amplification de l'ADNr 16S est réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec un kit Invitrogen, en utilisant deux amorces : 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Le mélange réactionnel contient, pour un volume final de 50  $\mu\text{L}$  :

Tampon PCR 1X (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 9,0 à 25°C).

MgCl<sub>2</sub> : 1,5 mM.

dNTP : 200 mM.

Amorce 27f : 1 mM.

Amorce 1492r : 1 mM.

Taq DNA polymerase : 1,25 U.

Extrait ADN : 1 µL (500 ng).

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur " STRATAGENE RoboCycler Gradient 96" selon le profil suivant:

- Une étape initiale de dénaturation à 98°C pendant 3 min, suivie de l'addition de Taq polymérase.

- 30 cycles d'amplification à 94°C pendant 1 min, 52°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min.

- Une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 min.

Les amplifias obtenus sont visualisés sur gel d'agarose comme précédemment décrit.

#### 4.5. Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage est effectué par GenomExpress (Toulouse, France) dans un séquenceur automatique. Les amorces sont les mêmes que celles utilisées lors de la PCR. Une fois la séquence déterminée, elle est comparée à celles des espèces de référence disponibles dans les banques génomiques de données en utilisant le "NCBI Blast" disponible sur Internet au niveau du site Web : *ncbi.nlm.nih.gov*

Cette comparaison permettra d'évaluer les pourcentages de similarité entre les séquences des différentes espèces de référence.

#### 4.6. Analyses phylogénétiques

Une fois les séquences déterminées, elles sont utilisées pour connaître la position phylogénétique de l'actinomycète. Plusieurs méthodes de calculs sont disponibles sous forme de programmes informatisés sur le web. Ces programmes mettent à disposition plusieurs outils de traitement des séquences nucléotidiques, comme les outils d'inversion des séquences, de conversion entre les différents formats des fichiers des séquences, d'alignement (simple, double ou multiple) et des outils de recherche et de comparaison avec les banques de données génomiques. Parmi ces outils, on peut citer le « BLAST » qui est un outil de recherche d'homologies entre une séquence et une banque de séquences.

Les séquences sont alignées grâce au logiciel « Clustal W ». Ce dernier permet de déterminer d'abord un arbre phylogénétique basé sur l'homologie entre les séquences et ensuite d'aligner successivement les séquences les plus proches en procédant de façon hiérarchique une paire à la fois. Les analyses phylogénétiques sont effectuées par les méthodes de calcul des matrices de distances d'évolution de Jukes et Cantor (1969) et en utilisant les méthodes de "Neighbor-Joining" (Saitou et Nei, 1987) pour les algorithmes de construction des topologies des arbres phylogénétiques. La méthode de validation statistique des liens phylogénétiques établis est le Bootstrap (Felsenstein, 1981).

### III. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTAGONISTES DES SOUCHES DE *STREPTOSPORANGIUM*

#### 1. Microorganismes-cibles

---

Lors d'un criblage préliminaire, les isolats de *Streptosporangium* sont testés pour leurs activités antibiotiques contre les microorganismes-cibles suivants :

- *Micrococcus luteus* ATCC 9314 (*Micrococcaceae*), cocci à Gram positif.
- *Escherichia coli* ATCC 10536 (*Enterobacteriaceae*), coccobacille à Gram négatif.
- *Pseudomonas fluorescens* PF11 (*Pseudomonadaceae*), bacille à Gram négatif.
- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226, levure ascosporeuse.
- *Mucor ramannianus* NRRL 1829, champignon filamenteux (Zygomycète, *Mucorales*).

#### 2. Technique des stries croisées

---

L'objectif de cette étude est de sélectionner parmi les isolats de *Streptosporangium*, ceux présentant une activité antibiotique intéressante. Les plus intéressants sont retenus pour une étude approfondie de leurs antibiotiques. Cette étude a concerné tous les isolats.

L'activité anti-microbienne des souches de *Streptosporangium* est évaluée par la méthode des stries croisées sur le milieu ISP2 solide. Cette méthode consiste à ensemencer la souche d'actinomycète en un seul trait à la surface du milieu et en bordure de la boîte de Pétri (diamètre = 9 cm). Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les souches-tests sont ensemencées perpendiculairement à l'actinomycète. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures de la souche-cible et de la souche de *Streptosporangium*, après 24 h d'incubation pour les bactéries et la levure et 48 h pour le champignon.

### IV. ÉTUDE APPROFONDIE DES ANTIBIOTIQUES DES TROIS SOUCHES DE *STREPTOSPORANGIUM*

Trois souches de *Streptosporangium*, n° Sg3, Sg163 et Sg10, ayant montré une activité antibiotique intéressante, ont été sélectionnées pour l'étude de leurs antibiotiques.

#### 1. Détermination du spectre d'action des trois souches de *Streptosporangium* sur milieu solide

---

La méthode utilisée est celle des stries croisées sur milieu ISP2, décrite dans le paragraphe III.2. Les microorganismes suivants sont utilisés comme cibles pour cette étude.

- Des bactéries à Gram positif : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Staphylococcus aureus* CIP 7625.

- Des bactéries à Gram négatif : *Agrobacterium tumefaciens* A2410, *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 A964, *Erwinia amylovora* E1994, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* E1336, *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* X1119, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas fluorescens* PF11 et *Serratia marcescens* SM80.

- Des levures : *Candida albicans* IPA 200, *C. albicans* IPA 224, *Kluyveromyces lactis* K231, *Rhodotorula mucilaginosa* R254 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226.

- Des champignons dont des phytopathogènes et des toxigènes : *Aspergillus carbonarius* M333, *Aspergillus ochraceus* ATCC 3174, *Botrytis cinerea* B354, *Fusarium culmorum* F3288, *Fusarium graminearum* F5883, *Fusarium sporotrichioides* F13440, *Fusarium verticilloides* F6442, *Geotrichum candidum* G669, *Mucor ramannianus* NRRL 1829, *Penicillium citrinum* P1843, *Penicillium verrucosum* P1850, *Penicillium* sp., *Pythium irregulare* PY120 et *Sclerotium sclerotiorum* S358.

## 2. Production des antibiotiques par les souches de *Streptosporangium* sur divers milieux liquides

En vue de rechercher le meilleur milieu de production, une cinétique est suivie sur différents milieux de culture pour deux souches de *Streptosporangium* : Sg3 et Sg163.

Dans un premier temps, un milieu synthétique additionné de glucose ou d'amidon, et avec ou sans extrait de levure et CaCO<sub>3</sub> et le milieu ISP2 (milieu complexe) sont testés et comparés. Ces milieux de culture (par litre) sont :

Milieu minéral + amidon (10 g).

Milieu minéral + amidon (10 g) + extrait de levure (2 g).

Milieu minéral + amidon (10 g) + CaCO<sub>3</sub> (2 g).

Milieu minéral + amidon (10 g) + extrait de levure (2 g) + CaCO<sub>3</sub> (2 g).

Milieu minéral + glucose (10 g).

Milieu minéral + glucose (10 g) + extrait de levure (2 g).

Milieu minéral + glucose (10 g) + CaCO<sub>3</sub> (2 g).

Milieu minéral + glucose (10 g) + extrait de levure (2 g) + CaCO<sub>3</sub> (2 g).

Milieu ISP2.

La composition du milieu minéral et de l'ISP2 est donnée en annexe 3.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé le milieu ISP2 à des milieux de culture préconisés par plusieurs auteurs pour la production d'antibiotiques. Ces milieux sont :

le milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966).

le milieu Bennett (Warren *et al.*, 1955) à base de glucose, de peptone, d'extraits de levure et de viande.

le milieu ISP4 (Shirling et Gottlieb, 1966) à base d'amidon et de sels minéraux.

le milieu de Gilpin *et al.* (1995), à base de glycérol, de peptone de soja, d'extraits de levure et de malt.

le milieu de Omura *et al.* (1989), à base de glucose, de peptone, d'extrait de viande, d'extrait de levure, de NaCl et de CaCO<sub>3</sub>.

La composition détaillée des milieux de culture est donnée en annexe 3.

Pour chaque souche, une pré-culture de quatre jours est préparée dans des tubes contenant 2 mL d'ISP2. Cette pré-culture est utilisée pour ensemercer 100 mL du même milieu liquide contenu dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL. L'incubation a lieu à 30°C dans des conditions d'agitation permanente, à 250 rpm pendant 13 jours.

Les activités sont recherchées par la méthode de diffusion des puits. Une aliquote de 0,2 mL de bouillon de culture est prélevée stérilement puis introduite dans un puits effectué dans une gélose d'ISP2 coulée en boîte de Pétri et préalablement ensemençée avec un germe cible. Les boîtes sont mises 4 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées pendant 24 à 48 h à 30°C. Le diamètre des zones d'inhibition est alors mesuré.

### 3. Cinétique de production d'antibiotiques en milieu ISP2

---

#### 3.1. Pré-cultures

Pour les pré-cultures, les spores et les fragments mycéliens sont raclés à partir d'une culture en boîte de Pétri de la souche de *Streptosporangium* âgée de 6 à 7 jours, et inoculés dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu ISP2. Après 6 jours d'incubation, cette pré-culture est utilisée pour inoculer les milieux de production.

#### 3.2. Cinétique de production

Au cours de cette étude, le suivi de la production globale est réalisé en milieu ISP2 dans des fioles d'Erlenmeyer et en fermenteur. La croissance et le pH sont également mesurés.

La production des antibiotiques est mesurée par la méthode de diffusion des puits contre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Mucor ramannianus*. Pour certains antibiotiques de la souche n° Sg3 colorés naturellement en rouge, la production est également estimée en mesurant l'absorbance du filtrat de culture à 500 nm.

La croissance est calculée par la mesure du poids sec de la biomasse en utilisant la méthode des filtres-membranes. L'échantillon prélevé est filtré sous vide à travers un filtre-membrane de 0,45 µm préalablement séché et taré. Le mycélium est lavé 3 fois à l'eau distillée. Le filtre contenant le mycélium, est placé dans une coupelle en aluminium et déposé dans un four à 105 °C pendant 24 h. Après refroidissement dans un dessiccateur, il est pesé. Le poids sec ainsi déterminé est ensuite rapporté au litre de volume de fermentation (exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture). Les pesées sont effectuées sur une balance analytique Sartorius.

##### 3.2.1. Cultures en fioles d'Erlenmeyer

Des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu ISP2 (pH 7,2) sont ensemençées avec 5 mL (5% du volume utile) de la pré-culture. Les cultures sont incubées



---

à 30°C et agitées à 240 rpm. Des prélèvements sont effectués en cours de fermentation, toutes les 24 h pendant 13 jours.

### 3.2.2. Cultures en fermenteur

Pour chaque fermentation, la pré-culture est réalisée dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu ISP2 (pH 7,2). Le volume utile est fixé à 1,5 L. L'ensemencement est effectué à partir d'un inoculum de 6 jours. Après 48 h d'incubation, une estimation du poids sec permet de fixer le volume de pré-culture nécessaire pour ensemencher le fermenteur de manière à avoir 0,2 g/L de biomasse. Un agent anti-mousse, le polyglycol P-2000 E, est ajouté au milieu. L'agitation est maintenue à 250 rpm. La température d'incubation est de 30°C.

Un échantillon de 50 mL est prélevé quotidiennement et analysé. La durée de la fermentation est de 13 jours.

## 4. Purification des antibiotiques

---

La purification des antibiotiques passe par les étapes suivantes : extraction par un solvant organique, semi-purification sur plaque épaisse de gel de silice et/ou par chromatographie sur colonne à basse pression (gel de Séphadex, gel de silice, etc.) et purification finale par HPLC. La figure 4 (page 37) montre un protocole général de purification.

### 4.1. Extraction des antibiotiques

Les antibiotiques produits peuvent être extraits à partir du mycélium et/ou du filtrat de culture.

#### 4.1.1. Extraction à partir du mycélium

Le mycélium est récupéré après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation (3000 g). Le culot mycélien est récupéré dans une fiole et immergé dans du méthanol. Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante. L'extrait méthanolique est ensuite obtenu par filtration sous vide puis concentré à sec. Les activités sont recherchées par la méthode des disques de papier.

#### 4.1.2. Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Cinq solvants de polarité croissantes ont été testés ; le *n*-hexane, le benzène, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol.

La culture est centrifugée puis filtrée. Le filtrat est mélangé dans une ampoule à décanter, avec un volume égal en solvant. Les phases organique et aqueuse sont récupérées séparément, concentrées à sec puis reprises dans un minimum de solvant (méthanol ou eau) et testées par antibiographie. La phase organique est préalablement déshydratée par passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) contenant du sulfate de sodium anhydre. Le but est d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles.

### 4.2. Traitement de la phase aqueuse au charbon actif

La purification des antibiotiques de la phase aqueuse est souvent difficile à cause des pigments bruns présents dans le milieu de culture et gênants lors des purifications; une décoloration s'avère donc nécessaire. Le traitement au charbon actif permet d'éliminer ces pigments en les adsorbant. Pour cela, le filtrat de culture est additionné de charbon à raison de 20 g/l. Le tout est mis en agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante, puis centrifugé. Le surnageant est filtré sous vide avec des filtres membranes de 0,45 µm. Le filtrat, initialement brun foncé, devient alors nettement plus clair.

### **4.3. Tests d'antibiographie**

Les différents extraits organiques obtenus à partir du mycélium ou des filtrats, ainsi que les phases aqueuses, sont testés pour vérifier leurs activités antimicrobiennes. Deux méthodes de diffusion sont utilisées au cours de ce travail: celle des puits et celle des disques de papier.

#### **4.3.1. Méthode de diffusion des puits**

Dans cette méthode, du milieu ISP2 semi-solide (12 g/L d'agar) en surfusion est pré-ensemencé avec le germe-cible avant d'être coulé en boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, des puits sont faits à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Une aliquote de 0,2 mL de surnageant de culture à analyser, est prélevée stérilement puis introduite dans le puits. Les boîtes sont mises 4 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits après 24 h (pour les bactéries et les levures) et 48 h (pour les champignons).

#### **4.3.2. Méthode de diffusion des disques de papier**

Des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 50 µL à 80 µL d'extrait à tester. Ils sont séchés pour faire évaporer le solvant, puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 30 min. Les disques imprégnés sont ensuite déposés à la surface du milieu ISP2 semi-solide (12 g/L d'agar), pré-ensemencé avec le germe-cible et coulé en boîtes de Pétri. Celles-ci sont mises à 4°C pendant 4 h avant d'être incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

### **4.4. Révélations microbiologiques : bioautographie**

#### **4.4.1. Préparation des plaques de gel de silice**

Les plaques de gel de silice sont préparées avec 40 g de silice G60 (Merck) dans 100 mL d'eau distillée dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL. Après une forte agitation (30 s environ), le gel obtenu est étalé de manière uniforme sur des plaques en verre (20 × 20 cm ou 10 × 20 cm) à l'aide de l'étaleur de Desaga réglé pour une épaisseur de 0,25 mm. Les plaques sont ensuite séchées à 40°C pendant une nuit et régénérées à 105°C avant utilisation.

#### **4.4.2. Dépôt des échantillons et développement des plaques**

A l'aide d'une microseringue, les échantillons sont déposés sur la plaque sous forme de spots par petites fractions. Les plaques sont ensuite placées dans une cuve de

---

chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le système de solvant.

Les systèmes de solvants utilisés sont :

*n*-butanol-acide acétique-eau (B.A.E.) : 60 : 20 : 20 , en volumes.

acétate d'éthyle-méthanol (A.M.) : 100 : 15, en volumes.

éthanol-ammoniaque-eau (E.A.E.) : 80 : 10 : 10, en volumes.

acétonitrile-eau (AN.E.) : 30 : 70, en volumes.

Eau bidistillée.

Après développement, les plaques sont séchées sous la hotte toute la nuit, afin d'éliminer toute trace de solvant susceptible d'empêcher la croissance du microorganisme-test lors de la bioautographie. Les chromatogrammes sont ensuite observés sous lumière ultra-violette pour localiser les taches présentant une absorbance à 254 nm ou une fluorescence à 365 nm.

#### 4.4.3. Bioautographie

La méthode utilisée est celle de Betina (1973). Les plaques sont placées sur un support en verre dans une boîte en polyéthylène (22 × 24 cm). Au fond de la boîte, une feuille de papier filtre imbibée d'environ 30 mL d'eau stérile permet de maintenir une atmosphère humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est alors stérilisé durant 1 h sous UV à 254 nm.

Un volume de 50 mL de gélose molle (7 g/L d'agar) d'ISP2 en surfusion (45 à 50°C) est inoculé avec 2 mL d'une suspension de germe-cible. Ce milieu est uniformément réparti avec une pipette stérile sur les plaques. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion de l'activité antibiotique dans le milieu puis incubées à 30°C. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 à 48 h et les Rf calculés.

#### 4.5. Semi-purification des antibiotiques sur plaques épaisses de gel de silice

Le gel est préparé de la même manière que pour la bioautographie mais avec 50 g de silice G60 et 120 mL d'eau bi-distillée. Ce gel est étalé sur des plaques de 20 cm de côté, avec une épaisseur de 0,5 mm. Après séchage et régénération des plaques, 300 à 400 µL d'extrait concentré sont déposés à l'aide d'une microseringue, en une bande mince et continue, à 3 cm du bord inférieur de la plaque. Les plaques sont ensuite développées dans un des systèmes de solvants (voir paragraphe 4.4.2.). Une bioautographie est parallèlement réalisée pour localiser avec précision les bandes actives. Celles-ci sont alors grattées et mises dans un Erlenmeyer avec 100 mL de solvant (méthanol ou eau selon les cas) afin de désorber les antibiotiques de la silice. Le tout est mis sous agitation magnétique pendant une heure à température ambiante puis filtré sous vide (sur verre fritté). Le filtrat méthanolique ou aqueux, concentré à sec puis repris dans un minimum de solvant (méthanol ou eau) est alors prêt pour être purifié par HPLC.

#### 4.6. Semi-purification des antibiotiques par chromatographie sur colonne

##### 4.6.1. Gel de Séphadex LH-20

Le gel de Séphadex LH-20 (Fluka) est utilisé pour la purification de l'extrait butanolique de la souche n° Sg3. Ce gel est équilibré avec du méthanol et déposé dans une colonne de 50 cm  $\square$  2 cm.

Des aliquotes de 1 à 2 mL du concentré de l'extrait brut butanolique sont par la suite déposées en surface et passées à travers ce gel en utilisant une phase mobile composée de 75% de méthanol dans l'eau (mode isocratique, à pression atmosphérique, débit 1,2 mL/min). Les fractions sont d'abord récoltées dans des tubes à raison de 5 mL par tube, puis récupérées en fonction des couleurs des bandes formées lors de la séparation. Les fractions actives sont localisées par antibiographie contre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Mucor ramannianus*.

### 4.6.2. Gel de Séphadex G25-80

Le gel de Séphadex G25-80 est utilisé pour la purification des antibiotiques hydrophiles notamment ceux de la souche n° Sg163.

Une phase stationnaire de gel de Sephadex G25-80 (Fluka) a été préalablement gonflé et coulé dans une colonne en verre (dimensions 50 cm  $\square$  2 cm) et équilibré avec de l'eau bi-distillée. Des aliquotes de 1 à 2 mL du concentré de la phase aqueuse sont par la suite déposées en surface et passées à travers ce gel en utilisant de l'eau bi-distillée comme phase mobile à un débit de 1,2 mL/min. Des fractions de 5 mL sont récoltées en tubes, concentrées et testées par antibiographie contre *Saccharomyces cerevisiae* pour détecter les fractions actives.

### 4.7. Purification par HPLC

La Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée comme dernière étape de purification des antibiotiques. L'appareil de type Waters, comprend un contrôleur 600, une pompe 600 à 4 voies, un détecteur UV 2487 et un enregistreur Linear. La colonne contient une phase inverse C18 (250 mm  $\square$  7,8 mm UP ODS, granulométrie 5  $\mu$ m). Elle est précédée d'une pré-colonne contenant la même phase stationnaire. La phase mobile est un mélange de méthanol-eau (ou de l'eau bi-distillée seule) en gradient continu (courbe convexe) de 20 à 100% pendant 45 min, ou discontinu (20, 40, 60, 80 et 100%) selon les antibiotiques. Le débit utilisé est de 1,2 à 1,5 mL/min et la détection en UV à 220 nm. Ces conditions de purification ont été déterminées après plusieurs expériences préliminaires. Les différentes fractions récoltées sont concentrées puis testées par antibiographie. La purification finale est obtenue après 3 à 5 ré-injections selon les cas.

## 5. Étude physico-chimique et spectroscopique des antibiotiques

---

### 5.1. Réactions chromogéniques

Des révélations chimiques ont été effectuées sur des plaques de gel de silice (CCM) développées de la même manière que pour les bioautographies pour avoir une idée sur la nature chimique des antibiotiques.

**Les principaux révélateurs utilisés (Merck, 1975) sont les suivants :**

- la ninhydrine : révélateur des fonctions amines.
- le naphthorésorcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : révélateur des glucides.

- l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : révélateur des glucides, des stéroïdes et des terpènes.
- la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées.
- le chlorure de fer ferrique : révélateur des phénols.
- le formaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : révélateur des composés aromatiques polycycliques.

Les taches colorées peuvent apparaître à froid ou parfois à chaud (5 min à 100°C). Les méthodes détaillées sont données en annexe 4.

## 5.2. Spectroscopie dans l'Ultra-Violet et le visible

Insuffisante pour identifier une structure, la spectroscopie UV-visible permet, pour de faibles quantités d'antibiotiques, de détecter les composés aromatiques et les systèmes insaturés et conjugués.

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 20 entre les longueurs d'onde 200 et 500 nm pour les produits purs et semi-purs.

## 5.3. Spectroscopie Infra-Rouge

Les spectres infrarouges (IR) ont été obtenus avec un spectrophotomètre Perkin Elmer RT-IR 1760 X entre 400 et 4000 cm<sup>-1</sup> sur une cellule en diamant pour les antibiotiques de la souche Sg3 et sur un modèle Shimadzu IR 470 pour ceux de la souche Sg163.

## 5.4. Spectrométrie de masse

Les masses des antibiotiques purs sont déterminées avec un spectromètre LCQ ion-trap (Finnigan MAT, San Jose, CA). La technique utilisée est celle de "Nano-Electrospray Ionisation" (Nano-ESI-IT-MS) qui permet de déterminer le poids moléculaire des antibiotiques en très faible quantité, ainsi que ceux des fragments qui en résultent après ionisation des ions parents.

L'analyse est réalisée en mode positif et en mode négatif. Le programme d'analyse utilisé est Xcalibur 1.2 de ThermoDuest (San Jose, USA).

## 5.5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13

Les études RMN ont été réalisées avec un spectromètre Bruker AMX400. Les échantillons (entre 1 et 3 mg) ont été solubilisés dans 600 µl de diméthylsulfoxyde-*d*6 (DMSO-*d*6) ou de méthanol deutérié (CD<sub>3</sub>OD). Les signaux du proton <sup>1</sup>H et du carbone <sup>13</sup>C ont été attribués en fonction des déplacements chimiques des protons <sup>1</sup>H et des carbones <sup>13</sup>C, de l'intensité des signaux, ainsi que par les analyses de corrélations <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY45 et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC.

# III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

## CHAPITRE I. ISOLEMENT SÉLECTIF DES STREPTOSPORANGIACEAE À SPORANGES ET PROPRIÉTÉS ANTAGONISTES DES ISOLATS DE STREPTOSPORANGIUM

---

### I. ISOLEMENT SÉLECTIF DES STREPTOSPORANGIACEAE À SPORANGES

#### 1. Résultats

##### 1.1. Isolement sélectif selon les milieux de culture

Dans un but comparatif, nous avons d'abord testé trois milieux de culture préconisés dans la littérature pour l'isolement sélectif des actinomycètes rares : le milieu « chitine - vitamines B » (Nonomura, 1984), le milieu « acide humique - vitamines B » (Hayakawa et Nonomura, 1987) et le milieu au charbon « coal - vitamines B » (You et Park, 1991). Les trois milieux sont additionnés ou non d'un antibiotique connu pour son activité contre les bactéries à Gram négatif, l'acide nalidixique (Hayakawa *et al.*, 1991b) à raison de 20 mg/L. Deux sols de palmeraie, l'un originaire d'Adrar (AD1) et l'autre de Béni-Abbès (BA6) ont été examinés. Ils sont pré-traités ou non à la chaleur sèche à 120°C pendant 1 h (Nonomura et Ohara, 1969a). Les trois milieux sont additionnés d'un antifongique, le cycloheximide (50 mg/L).

Les *Streptosporangiaceae* à sporanges représentés dans notre cas par les genres *Streptosporangium*, *Planomonospora* et *Planobispora*, sont facilement reconnaissables par leur micromorphologie (figure 16). Le genre *Planotetraspora* n'a pas été détecté. Les colonies de *Streptosporangium* présentent un mycélium du substrat (MS) non fragmenté et un mycélium aérien (MA) portant des sporanges globuleux contenant chacun, une seule chaîne spiralée de spores rondes à ovoïdes, non mobiles. Les genres *Planomonospora* et *Planobispora* sont caractérisés par la production sur le MA, de sporanges cylindriques contenant chacun une et deux spores mobiles en bâtonnets respectivement. Les colonies d'actinomycètes sont donc observées au microscope optique pour repérer les trois genres cités précédemment et déterminer leur pourcentage par rapport au total des actinomycètes.

Les résultats (tableau 7) montrent que les pourcentages d'actinomycètes sont plus élevés sur le milieu à la chitine (jusqu'à 100%). Sur le milieu au charbon, les colonies bactériennes sont plus nombreuses que sur les autres milieux (figures 17a et b), mais leurs tailles sont très petites (1 mm de diamètre) et non gênantes pour la croissance des actinomycètes et leur dénombrement.

Le sol d'Adrar est représenté surtout par le genre *Planomonospora*, accompagné par d'autres genres comme *Streptomyces* (dominant), *Nocardiopsis*, *Actinoplanes* et *Spirillospora*. Le genre *Streptosporangium* n'a été mis en évidence que sur le milieu à la chitine et ce, en très faibles pourcentages. Un seul isolat de *Planobispora* a été détecté dans l'échantillon de sol AD1 prétraité à la chaleur et sur milieu chitine avec acide nalidixique (résultat ne figurant pas dans le tableau 7).

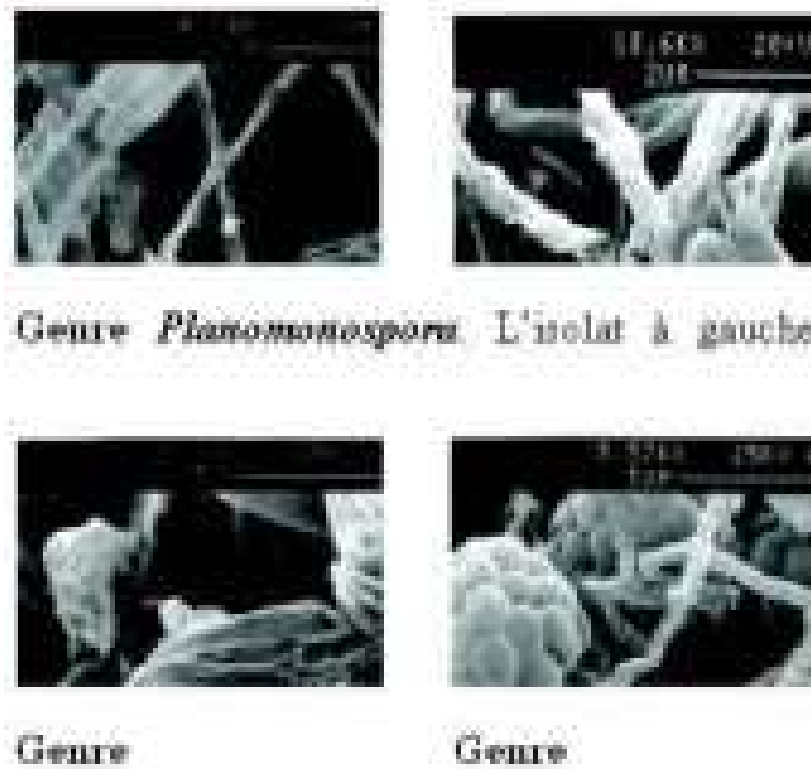


Figure 16. Micromorphologie en microscopie

Milieu de culture			Sol AD1			Sol BA6		
			Actino.	$\Sigma g$	Pm	Actino.	$\Sigma g$	Pm
Milieu à la chitine	Na <sup>+</sup>	T	100	0,13	0,34	79,67	4,41	0,55
		P	86,23	0,20	1,30	71,57	5,58	1,35
	Na <sup>-</sup>	T	41,3	0,15	2,34	33,46	1,83	0,34
		P	77,23	0,34	1,98	38,84	8,62	1,14
Milieu à l'acide benzoïque	Na <sup>+</sup>	T	75,89	0	2,31	40,34	0	1,53
		P	77,51	0	3,58	34,91	0,31	0,27
	Na <sup>-</sup>	T	60,85	0	2,34	37,14	2,31	1,13
		P	78,02	0	5,34	60,21	4,17	2,5
Milieu au charbon	Na <sup>+</sup>	T	87,95	0	2,78	20,95	4,88	3,04
		P	92,00	0	4,31	39,78	4,14	1,96
	Na <sup>-</sup>	T	24,89	0	2,5	12,00	2,34	0,85
		P	31,04	0	5,88	17,71	4,16	3,48

Tableau 7. Distribution des actinomycètes, des *Streptosporangium* et *Planomonospora* selon les sols et les milieux de culture.

**Note.** Les valeurs expriment le pourcentage des actinomycètes totaux (Actino.) par rapport à la microflore totale et celui des *Streptosporangium* (Sg.) et *Planomonospora* (Pm.) par rapport aux actinomycètes totaux.

Nal+ = milieu avec acide nalidixique, Nal- = milieu sans acide nalidixique.

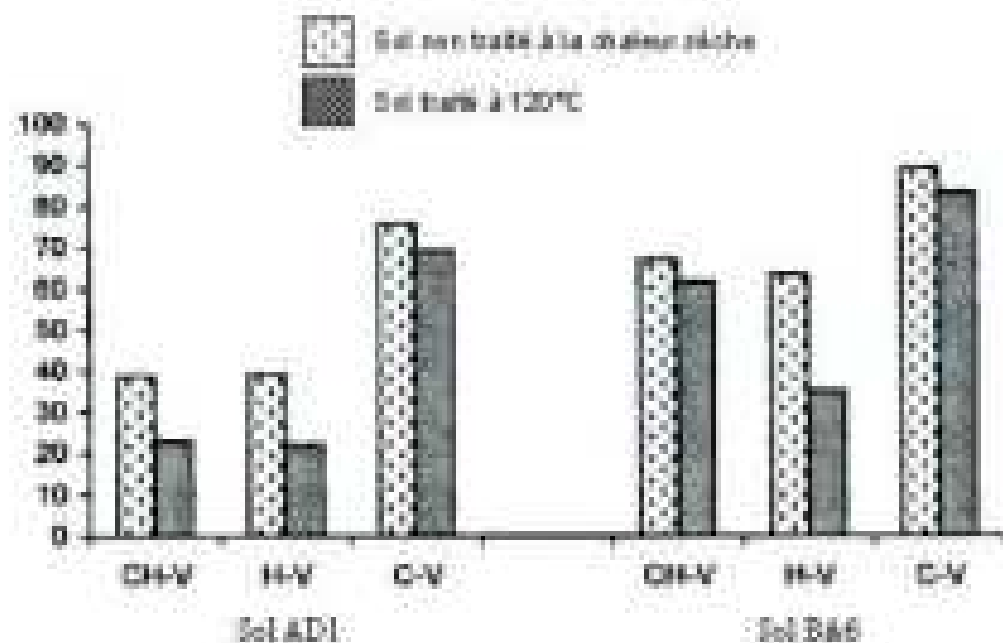
P et T = sols traités et non traités à la chaleur sèche (120°C, 1 h) respectivement.

Le sol de Béni-Abbès est par contre, représenté surtout par le genre *Streptosporangium*. Les isolats de *Planomonospora* sont également détectés en nombre appréciable. Les autres genres d'actinomycètes sont représentés par des *Streptomyces* et quelques *Actinomadura*.

Le prétraitement des échantillons à la chaleur sèche a permis de réduire le pourcentage des bactéries pour les 2 sols et sur les 3 milieux de culture (figure 17a).

L'acide nalidixique réduit remarquablement le nombre de bactéries surtout pour le sol d'Adrar (figure 17b) où le pourcentage des bactéries est réduit de moitié. De ce fait, le pourcentage des actinomycètes totaux a augmenté sur les trois milieux de culture.

Le pourcentage d'actinomycètes le plus élevé est observé pour les deux sols sur le milieu à la chitine, suivi du milieu à l'acide humique puis le milieu au charbon. Le milieu à base de chitine reste donc globalement le meilleur pour la sélection des actinomycètes. La meilleure combinaison utilisable pour l'isolement sélectif des *Streptosporangium* s'avère être « sol pré-traité à 120°C - milieu chitine-vitamines B - sans acide nalidixique ». Pour les *Planomonospora*, « sol pré-traité à 120°C - milieu chitine-vitamines B – avec ou sans acide nalidixique ».



**Figure 17a.** Influence du prétraitement des échantillons de sol à la chaleur sèche (120°C, 1 h) sur la réduction du pourcentage de bactéries dans les 3 milieux de culture. CH-V, milieu chitine-vitamines B ; H-V, milieu acide humique-vitamines B ; C-V, charbon-vitamines B. Ces milieux ne contiennent pas d'acide nalidixique.



## 1.2. Isolement sélectif selon les antibiotiques

Le milieu « chitine-vitamines B » s'est révélé favorable pour la sélection des actinomycètes. Nous l'avons retenu pour examiner 30 échantillons de sol, en lui ajoutant 11 antibiotiques (voir matériel et méthodes, page 58) pris un à un, à des concentrations précises. Les résultats sont illustrés par le tableau 8.

Sols		Genres de <i>Streptosporangiaceae</i> à spores			Nombre total d'isolats par échantillon de sol
		<i>Streptosporangium</i>	<i>Planomonospora</i>	<i>Planobispora</i>	
Adrar	AD1	5 (gen)	4 (T) + 1 (stp)	1 (T) + 1 (oxy)	21
	AD2	1 (T)	0	0	1
Béni-Abbès	BA1	0	5 (T) + 1 (cyc)	0	4
	BA2	1 (T) + 1 (gen) 1 (kan) + 1 (gen)	3 (T) + 2 (cyc)	0	9
	BA3	0	1 (P)	0	1
	BA4	0	1 (cyc) + 1 (gen)	0	2
	BA5	0	1 (T) + 1 (cyc)	0	2
	BA6	3 (T) + 3 (P) + 2 (cyc)	3 (T) + 1 (P)	0	12
	BA7	2 (P)	0	0	2
	BA8	1 (T) + 1 (cyc) + 3 (P)	1 (P)	0	8

**Tableau 8.** Distribution dans les échantillons de sol des isolats de *Streptosporangiaceae* à spores isolés sélectivement par différents antibiotiques.

**Note.** Le milieu utilisé est « chitine-vitamines B-agar ».

T : sol témoin non traité à la chaleur sèche et analysé sans agents sélectifs.

P : sol pré-traité à 120°C pendant 1 heure et analysé sans agents sélectifs.

cyc : cyclosérine (10 mg/L); gen : gentamicine (10 mg/L); kan : kanamycine (25 mg/L); oxy : oxytétracycline (25 mg/L); pen : pénicilline (25 mg/L); poly : polymyxine (25 mg/L); stp : streptomycine (10 mg/L).

Parmi les 30 échantillons de sol examinés, les *Streptosporangiaceae* à spores sont détectés dans 12 échantillons : dans les 2 sols d'Adrar, ceux de Béni-Abbès et de Bouda et 1 de Tolga (TL2). Des trois genres, *Planomonospora* est le plus répandu, avec 37 isolats obtenus à partir de 10 échantillons de sol. *Planobispora* est le plus rare; seuls 5 isolats sont détectés. Les *Streptosporangium* (31 isolats) ont été mis en évidence dans 7 échantillons, notamment ceux de Béni-Abbès (4), d'Adrar (2) et de Tolga (1). Ils sont absents des sols de Touggourt et la majorité de ceux de Tolga, qui sont assez salés, ainsi que tous les sols se trouvant en dehors des palmeraies (Hoggar, Gassi-Touil). Ceci confirme les résultats de Boudjella (1994) et Bouti (1997) qui ont fait les mêmes constatations. Les souches récoltées proviennent d'échantillons non salés ou moyennement salés.

Les autres actinomycètes isolés sont représentés par les genres *Streptomyces* (dominant), *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Nocardia* et *Spirillospora*.

Il est à signaler que le pré-traitement des sols à 120°C pendant 1 h, préconisé par Nonomura et Ohara (1969a) pour la sélection des genres rares a nettement facilité l'isolement des *Streptosporangium* en éliminant un grand nombre de bactéries assez gênantes.

La pénicilline et à un degré moindre la cyclosérine ont permis d'obtenir 9 et 3 isolats de *Streptosporangium* respectivement. La gentamicine et la kanamycine, 1 seul isolat chacune.

Le nombre le plus élevé d'isolats de *Planomonospora* est obtenu dans les sols T (non traités et sans agents sélectifs) (21 isolats) suivi de la cyclosérine (8 isolats). Un seul isolat est obtenu avec la streptomycine, la pénicilline, la kanamycine et la polymyxine.

Le genre *Planobispora* est très rare de par le monde. Il a été détecté dans 2 parmi les 30 échantillons de sols examinés (AD1 et TL2). Parmi les 5 isolats, 3 sont obtenus avec la cyclosérine, la pénicilline et l'oxytétracycline.

## 2. Discussion

L'importance des actinomycètes rares est démontrée par le fait que plusieurs produits antimicrobiens trouvés sur le marché sont produits par ces actinomycètes (Lazzarini *et al.*, 2000). C'est l'exemple des rifamycines produites par *Amycolatopsis mediterranei*, l'érythromycine par *Saccharopolyspora erythraea*, la teicoplanine par *Actinoplanes teichomyceticus*, la vancomycine par *Amycolatopsis orientalis* et la gentamicine par *Micromonospora purpurea* (Lancini et Lorenzetti, 1993). Du fait de leur rareté, ces actinomycètes ne sont pas facilement isolés comme le genre *Streptomyces*. Des méthodes sélectives basées sur différentes approches, sont développées pour leur isolement. Ces approches concernent le choix de l'origine des échantillons de sol, le traitement de ces échantillons par des moyens physiques ou chimiques, l'utilisation de milieux de culture dont la composition favorise plus les actinomycètes rares et l'incorporation dans le milieu de culture d'agents antimicrobiens. Le but de toutes ces approches est d'empêcher la croissance des bactéries non mycéliennes pour favoriser celle des actinomycètes qui est assez lente.

Dans notre cas, le choix de l'origine des échantillons de sol n'est pas aléatoire. Les chercheurs dans le monde explorent des échantillons de sol provenant d'environnements particuliers comme les milieux extrêmes espérant ainsi découvrir de nouvelles souches ou espèces capables de produire de nouvelles molécules antibiotiques. Les échantillons de sol examinés dans notre cas proviennent de différentes régions arides du Sud algérien. Ces écosystèmes particuliers ont prouvé être une source riche d'actinomycètes rares (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998) et de nouvelles espèces productrices de nouveaux antibiotiques (Zitouni *et al.*, 2004a, b; Badji, 2006).

Le prétraitement des échantillons à la chaleur sèche préconisé par Nonomura et Ohara (1969a) est destiné à réduire le pourcentage des bactéries sur le milieu d'isolement. Ce traitement basé sur la résistance des spores d'actinomycètes à la dessiccation détruit les cellules bactériennes végétatives. Dans notre cas, ce traitement a donné des résultats similaires à ceux de Nonomura et Ohara (1969a), Hayakawa et Nonomura (1984) et Hayakawa *et al.* (1991a, b). Ces auteurs l'ont utilisé avec succès pour l'isolement des *Streptosporangium* sur différents milieux de culture.

L'acide nalidixique a été utilisé par Hayakawa *et al.* (1991b) dans le but d'éliminer les bactéries ayant résisté au pré-traitement à la chaleur sèche. Ces auteurs l'ont incorporé au milieu de culture « HV-agar » et ont pu isoler sélectivement des souches

de *Streptosporangium*. Dans notre cas, cet agent sélectif a permis de réduire le nombre de bactéries et a favorisé la croissance des actinomycètes en général. Cependant, les pourcentages de *Streptosporangium* sont plus élevés sur les 3 milieux de culture sans acide nalidixique.

Les chercheurs ont également élaboré des milieux de culture spéciaux sur lesquels la croissance des micro-organismes rares est favorisée. Ces milieux sont composés de sources de carbone difficilement utilisables par les bactéries non mycéliennes. C'est le cas de la chitine, de l'acide humique et du charbon. Les résultats de notre travail montrent que le milieu à base de chitine (Hayakawa et Nonomura, 1987) s'est révélé meilleur que ceux à l'acide humique et au charbon pour la sélection des *Streptosporangium* et des actinomycètes en général. Dans notre laboratoire, dès 1983, Ali Ousalah travaillant sur deux échantillons de sol de palmeraie, a testé plusieurs milieux de culture préconisés pour le dénombrement et la sélection des actinomycètes d'une manière générale et a retenu le milieu à base de chitine de Lingappa et Lockwood (1962) qui lui a donné les meilleurs résultats. Par la suite, une variété de milieux de culture ont été testés par Boudjella (1994) pour la sélection des actinomycètes rares (autres que *Streptomyces*). Lors de cette étude, le milieu « chitine-vitamines-agar » de Hayakawa et Nonomura (1987), différent de celui de Lingappa et Lockwood par sa composition qui est enrichie en sels minéraux et en vitamines B, a donné les meilleurs résultats. Ce milieu a été utilisé avec succès par Bouti (1997) pour l'isolement des *Streptosporangiaceae*.

Parmi les 11 antibiotiques testés, on peut retenir la cyclosérine comme agent sélectif des 3 genres de *Streptosporangiaceae*. Il est à noter que la cyclosérine n'a pas été utilisée comme agent sélectif par les chercheurs de par le monde, à l'exception de ceux de notre laboratoire (Boudjella, 1994; Bouti, 1997) dont les constats ont été à chaque fois similaires aux nôtres. La pénicilline s'est montrée également intéressante pour l'isolement des *Streptosporangium*. La gentamicine, la kanamycine, la polymyxine, l'oxytétracycline et la streptomycine ont aussi permis chacune la sélection d'un isolat des 3 genres. Ces agents sélectifs sont intéressants du fait qu'ils ont diminué fortement le nombre de bactéries non mycéliennes et nous ont permis d'obtenir des colonies isolées (même à des dilutions basses de  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$ ), contrairement au témoin sans antibiotique, où les colonies sont souvent confluentes avec d'autres microorganismes et très difficilement purifiables.

Pour la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés aux isolats de *Streptosporangium*. Une étude taxonomique préliminaire et une étude de leurs activités antagonistes nous permettront de choisir des taxons potentiellement intéressants comme producteurs d'antibiotiques.

## II. ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DES ISOLATS DE *STREPTOSPORANGIUM*

Les actinomycètes rares regroupent quelques dizaines de milliers d'isolats dans le monde, dont la distribution est basée sur une description taxonomique préliminaire (Lazzarini *et al.*, 2000). Dans les nouveaux programmes de découverte de molécules antibiotiques à intérêt industriel, le nombre élevé d'isolats ne permet pas une description taxonomique complète de tous les isolats. Ces derniers ont donc tendance à être groupés sur la base d'une description morphologique et seules les souches capables de produire des composés intéressants sont complètement caractérisées.

Les 31 isolats de *Streptosporangium* que nous avons sélectionnés ont fait l'objet d'une étude morphologique. Le but est de classer les isolats dans des groupes morphologiques homogènes.

Tous les isolats sont caractérisés par un mycélium du substrat (MS) non fragmenté et un mycélium aérien (MA) dont les hyphes portent des sporanges globuleux (sessiles ou portés par de courts sporangiophores) dont le diamètre varie entre 4 et 18 µm, chacun d'eux contenant une seule chaîne spiralée de spores rondes à ovoïdes de 1 à 2 µm de diamètre (tableau 9).

Les isolats sont répartis en six groupes morphologiques (G):

- Le groupe G1 est constitué par 2 isolats (Sg3 et Sg294) à MA rose vif à foncé et à MS rouge-brunâtre à rouge-rose foncé. Les 2 isolats produisent des pigments solubles (PS) de même couleur que le MS.

Groupe morphologique et n° d'isolat	CRÉDENCE	MACROMORPHOLOGIE			MICROMORPHOLOGIE		
		Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Pigments solubles	Taille des sporanges	Longueur des sporangiophores	Spores
G1 Sg3 - Sg294	Moyenne à forte teneur	Rose vif à foncé	Rouge-brunâtre à orange-rouge foncé	Rose vif à foncé	4 à 14 µm de Ø	Sessile ou 2 à 4 µm	Microsphériques et ovales à rondes 1 à 2 µm de Ø
G2 Sg1 - 3 - 4 - 7	Faible ou ISP1-4 ISP4 et faibles ou ISP2 et OYG	Rose à rose pâle	Faible orange	-	4 à 18 µm de Ø	Sessile ou 2 à 4 µm	Méan
G3 Sg120 - Sg128	Méan	Méan-rouge ou-rose à rose pâle	Faible orange	-	4 à 18 µm de Ø	Sessile ou 2 à 4 µm	Méan
G4 Sg143	Méan	Rose pâle à rose orange pâle	Orange-rouge à orange-rose clair	Jaune orange	4 à 18 µm de Ø	Sessile ou 2 à 4 µm	Méan
G5 Sg18	Moyenne à forte	Méan-rouge ou ISP1 et faible à absent ou les autres milieux	Orange-rouge brunâtre ou orange-jaunâtre	-	4 à 8 µm de Ø	Sessile ou 2 à 4 µm	Méan

**Tableau 9.** Caractéristiques morphologiques des isolats de *Streptosporangium*.

**Note.** Les milieux utilisés sont : ISP2, ISP3, ISP4 et OYG (voir composition en annexe 2).

- - Le groupe G2 est représenté par 4 isolats (Sg1, Sg2, Sg4 et Sg7) à MA blanc-rosâtre, rose clair à mauve pâle. Le MS est jaune-orange. Les sporanges ont un diamètre compris entre 6 et 18  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- - Le groupe G3 (2 isolats: Sg120 et Sg158) est macromorphologiquement proche du G2. Cependant, les sporanges sont plus petits (4 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre).
- - Le groupe G4 contient l'isolat n° Sg163 à MA rose clair et à MS orange-jaune à orange-brun clair. Cet isolat sécrète un pigment soluble jaune-orange sur ISP2.
- - Le groupe G5 est représenté par l'unique isolat, Sg10, à MA blanc-rosâtre ou absent, suivant les milieux, et à MS orange brunâtre, orange-rose à orange jaunâtre.
- - Le groupe G6, numériquement plus important, est constitué de 21 isolats à MA souvent assez fourni, rose pâle à rose vif et un MS ressemblant à celui des souches du G5.

### III. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ ANTAGONISTE DES ISOLATS DE *STREPTOSPORANGIUM*

Dans le but de sélectionner des souches productrices d'antibiotiques, l'activité des 31 isolats de *Streptosporangium* est testée par la méthode des stries croisées sur milieu ISP2 solide contre 5 souches tests, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas fluorescens* PF11, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226 et *Mucor ramannianus* NRRL 1829.

#### 1. Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau 10. Tous les isolats sont actifs contre la bactérie à Gram positif *Micrococcus luteus*. Ils possèdent également, selon les isolats, une activité contre les bactéries à Gram négatif et les champignons.

L'isolat n° Sg3 (G1) présente une bonne activité contre *M. luteus*, aucune activité contre les 2 bactéries à Gram négatif et une activité moyenne contre la levure et le champignon.

Les isolats du G2 et G3 présentent tous une activité contre la bactérie à Gram positif. L'activité contre la levure et le champignon est selon les isolats, nulle ou faible à moyenne. Les bactéries à Gram négatif ne sont pas inhibées.

L'isolat n° Sg163 (G4) est le seul à inhiber fortement *Saccharomyces cerevisiae*. Il possède aussi une bonne activité contre *Mucor ramannianus* et *Micrococcus luteus* mais pas contre les bactéries à Gram négatif.

L'isolat n° Sg10 (G5) possède aussi une activité antibactérienne (contre la bactérie à Gram+) et antifongique appréciable. *Pseudomonas fluorescens* est faiblement inhibée.

Isolats	Isolats	Microorganismes cibles				
		<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Z. ramibria</i>	<i>M. romanzoffii</i>
G1	Sg1	20	0	0	7	10
	Sg204	12	0	0	2	0
G3	Sg3	7	0	0	1	2
	Sg5	13	0	0	15	0
	Sg6	20	0	0	30	2
G5	Sg7	26	0	0	0	0
	Sg10	7	0	0	2	7
G4	Sg13	12	0	0	7	0
	Sg163	18	0	0	24	25
G6	Sg18	40	0	2	6	12
	Sg7	30	2	2	1	30
	Sg361	40	2	2	2	6
	Sg348	27	1	2	6	36
	Sg17	20	4	4	1	2
	Sg14	19	9	2	2	7
	Sg15	20	2	2	2	2
	Sg20	22	2	2	1	7
	Sg20	20	4	2	2	7
	Sg21	18	0	0	15	4
	Sg22	15	2	2	4	2
	Sg24	20	2	2	2	12
	Sg26	18	4	4	1	4
	Sg29	14	2	4	2	30
	Sg30	20	2	2	2	7
	Sg31	20	4	2	2	4
	Sg32	20	2	2	0	6
	Sg33	20	2	2	4	2
	Sg34	20	2	2	2	11
	Sg37	20	2	2	2	2
Sg38	12	1	2	0	30	
Sg39	18	0	2	1	11	

Tableau 10. Activité antimicrobienne des isolats de *Streptosporangium*.

**Note.** Les résultats expriment les distances d'inhibition (en mm) mesurées par la méthode des stries croisées sur le milieu solide ISP2.

Les isolats du G6 sont les seuls à inhiber les bactéries à Gram négatif. La levure et le champignon filamenteux sont également inhibés. Pour ce dernier, l'activité est faible à forte selon les isolats.

Nous notons que l'activité antibactérienne la plus forte est enregistrée avec les isolats Sg10 (G5) et Sg361 (G6) contre la bactérie à Gram positif (*Micrococcus luteus*), et avec l'isolat Sg348 (G6) contre la bactérie à Gram négatif (*Pseudomonas fluorescens*). Les activités antilevurienne et antifongique les plus importantes sont notées pour l'isolat Sg163 (G4).

## 2. Discussion

Tous les isolats de *Streptosporangium* sont doués chacun d'au moins deux activités antibiotiques. Ces activités sont variées, antibactérienne, antifongique et/ou antilevurienne. Ces résultats sont intéressants par le fait qu'ils rendent compte du potentiel antimicrobien des membres du genre *Streptosporangium*. Celui-ci est ciblé dans le monde car il s'est révélé être une source de métabolites potentiellement utilisables, notamment les antibiotiques (Lazzarini *et al.*, 2000). Des efforts sont concentrés sur le développement et l'application massifs de méthodes sélectives pour son isolement.

Pour la suite du travail, nous avons sélectionné 3 isolats de *Streptosporangium* pour approfondir l'étude de leur taxonomie et de leurs activités antimicrobiennes. Il s'agit des isolats Sg3 (G1), Sg163 (G4) et Sg10 (G5). Le choix est fait principalement en fonction de leur activité antibiotique et également de leur position taxonomique. Ces 3 isolats sont morphologiquement différents entre eux et des espèces valides de *Streptosporangium* et pourraient peut être représenter des taxons originaux. Leurs activités antibiotiques sont également intéressantes. Nous avons évité de retenir les isolats du groupe G6, malgré leurs activités également intéressantes, car Bouti (1997) a montré, après une étude chimiotaxonomique et physiologique approfondie (suivie par l'application de la taxonomie numérique), qu'ils appartiennent à une espèce connue, *Streptosporangium pseudovulgare*. Cette espèce est justement connue pour produire ce type d'activité.

## CHAPITRE 2 : ÉTUDE TAXONOMIQUE ET DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT D'ACTINOMYCÈTE SG3

---

### I. ÉTUDE TAXONOMIQUE DE L'ISOLAT SG3

L'isolat Sg3 a été isolé par la méthode des suspensions-dilutions à partir d'un échantillon de sol d'Adrar (AD1) sur le milieu « chitine-vitamines B-agar » (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionné de pénicilline (25 µg/mL) et de cycloheximide (50 µg/mL).

#### 1. Détermination du genre

##### 1.1. Caractéristiques culturelles et micromorphologiques

Les colonies de l'isolat Sg3 cultivé sur divers milieux à 30°C pendant 14 jours sont circulaires et lisses avec un diamètre de 2-5 mm. Sa croissance est bonne sur les milieux ISP2 et modérée sur ISP3, ISP4 et OYG. Le mycélium est stable et non fragmenté. Le mycélium aérien (MA) est rose vif. Celui du substrat est rouge brunâtre violacé et produit un pigment soluble rouge sur tous les milieux. Le MA produit des sporanges globuleux de 3-8 µm de diamètre, contenant chacun une seule chaîne spiralée de spores non mobiles (figure 18). Les sporangiospores sont sphériques ou ovoïdes, de 1-1,5 µm de diamètre.



**Figure 18.** Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de l'isolat Sg3 cultivé pendant 14 jours à 30°C sur milieu ISP2.

## 1.2. Étude chimiotaxonomique

L'isolat Sg3 présente un chimiotype III B (Lechevalier et Lechevalier, 1970b) caractérisé par la présence de l'isomère DL de l'acide diaminopimélique (*meso* DAP) dans la paroi cellulaire, et le madurose comme sucre caractéristique dans les hydrolysats cellulaires. Ceux-ci contiennent également du glucose, du galactose, du ribose ainsi que des traces de mannose. Les phospholipides sont de type PIV contenant de la glucosamine et la phosphatidyléthanolamine (Lechevalier *et al.*, 1977).

## 1.3. Identification du genre

L'isolat Sg3 est rattaché au genre *Streptosporangium* (Nonomura, 1989) sur la base des caractères morphologiques (présence de mycélium aérien avec des sporanges sphériques à spores rondes non mobiles) et chimiques (paroi de type III B, phospholipides de type PIV).

## 2. Détermination de l'espèce

### 2.1. Étude physiologique

Le tableau 11 illustre les résultats des tests physiologiques de l'isolat Sg3. Vingt-huit (28) tests sont positifs et 37 sont négatifs. L'isolat Sg3 utilise l'arabinose, l'arbutine, l'amidon, la caséine, l'esculine, la gélatine, la dextrine, le glucose, le mannose, le lactose, le mannitol, le rhamnose, le tréhalose, le tween 80, la tyrosine et le xylose. Cet isolat ne dégrade pas l'adénine, l'adonitol, le cellobiose, le dulcitol, l'érythritol, le fructose, le galactose, le glycérol, l'inositol, le maltose, le mélibiose, le raffinose, le ribose, le saccharose, le sorbitol, la testostérone, la xanthine, l'hypoxanthine, le benzoate, le butyrate, le citrate, l'oxalate, le propionate, le succinate et le tartrate de sodium. Sg3 est résistant à la cyclosérine, l'érythromycine, la gentamicine, l'oxytétracycline, la pénicilline, la rifampicine, la



streptomycine et la vancomycine, ainsi qu'au chlorure de sodium et au tellurite de potassium. Les pigments mélanoides ne sont pas produits et aucune croissance n'est observée à 42°C, à pH 5 et 9 et en présence de violet cristal, de lysozyme, de phénol et d'azide de sodium.

### 2.2. Étude moléculaire: séquençage de l'ADNr 16S et phylogénie

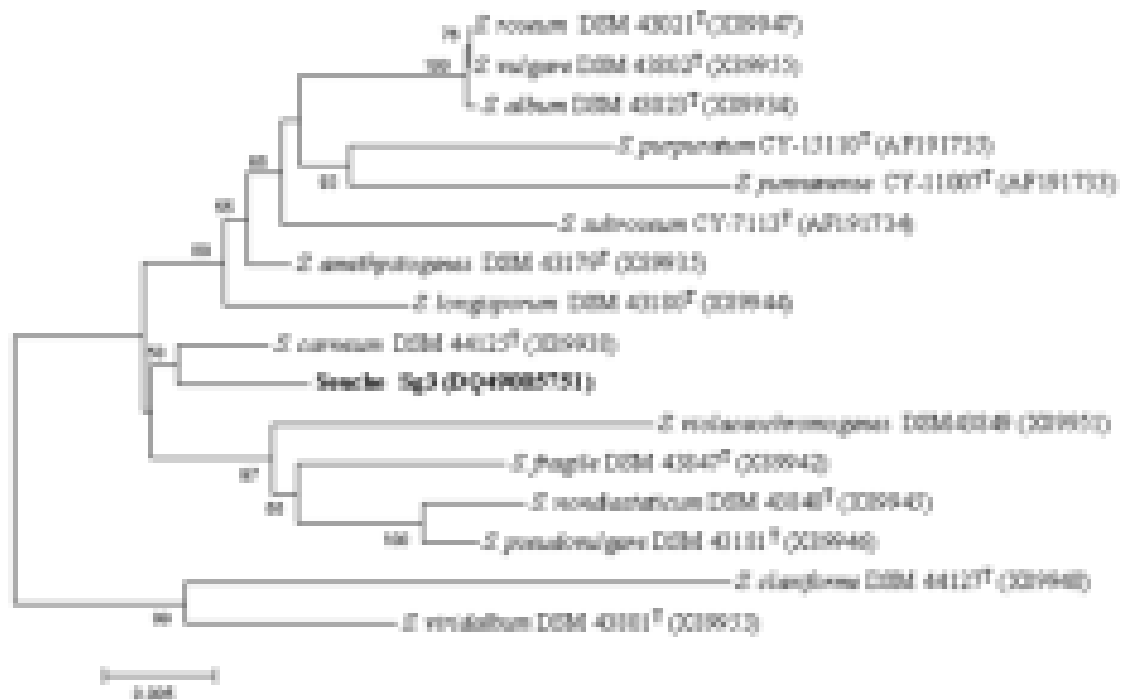
Une séquence de l'ADNr 16S de 1446 nucléotides a été déterminée et alignée avec les séquences de bactéries contenues dans la base de données GenBank. Le "BLAST" montre des taux de similitude entre 97,0 et 98,8 % avec les espèces de *Streptosporangium*. Le taux de similitude le plus élevé (98,8 %) étant avec *S. carneum* DSM 44125<sup>T</sup> l'espèce la moins différente. L'analyse phylogénique par la méthode du "neighbor joining" montre la position de l'isolat Sg163 et sa relation avec les souches types de *Streptosporangium* (figure 19).

	Réaction		Test		Réaction	
	lg	E. test <sup>1</sup>	lg	E. test <sup>1</sup>	lg	E. test <sup>1</sup>
<b>Utilisation de :</b>						
Adénine	-	-	<b>Utilisation de nitrate</b>	+	-	
Adénine	+	+	<b>Décoloration du violet de solène</b>			
Cytosine	+	+	adénine	+	+	
Uridine	+	-	inosine	-	-	
Uridine	+	-	guanine	-	-	
Adénine	+	-	cytosine	-	-	
Thymidine	-	+	uracile	-	-	
Thymidine	+	ND	cytosine	+	+	
Thymine	+	+	uracile	-	-	
Uridine	-	-	thymine	-	-	
<b>Hydrolyse :</b>						
Adénine	-	-	<b>Hydrolyse aux antibiotiques (mg/L)</b>			
Adénine	+	-	Chloramphénicol (25)	-	ND	
Uridine	-	+	Cycloheximide (10)	+	ND	
Uridine	+	-	Erythromycine (10)	+	ND	
Uridine	-	-	Genisteine (5)	+	+	
Uridine	-	-	Vancomycine (25)	-	ND	
Uridine	-	+	Banomycine (10)	-	ND	
Uridine	-	+	Chlortetracycline (25)	+	ND	
Uridine	+	+	Penicilline (2)	+	+	
Uridine	-	-	Rifampicine (2)	+	-	
Uridine	-	-	Streptomycine (10)	+	+	
Uridine	+	+	Vancomycine (2)	+	-	
Uridine	-	-				
Uridine	+	-	<b>Caténase aux protéines de (pH)</b>			
Uridine	+	+	Cystal violet (0,01%)	-	ND	
Uridine	-	-	Lysozyme (0,01%)	-	-	
Uridine	-	-	Phénol (0,1%)	-	ND	
Uridine	-	-	Tellurite de potassium			
Uridine	+	-	(0,001% and 0,01%)	+	ND	
Uridine	-	-	acide de solène (0,01%)	-	ND	
Uridine	-	-	Chlorure de sodium (2%)	+	+	
Uridine	+	+				
Uridine	+	-	<b>Caténase à :</b>			
Uridine	+	-	42°C	-	-	
Uridine	+	-	pH 5	-	ND	
Uridine	+	-	pH 9	-	ND	
<b>Production de pigment mélanoides</b>	-	-				

**Tableau 11.** Caractéristiques physiologiques et biochimiques de *Streptosporangium* sp. Sg3 en comparaison avec *S. carneum* DSM 44125<sup>T</sup>.

**Note.** +, test positif ; -, test négatif ; ND, test non déterminé.

*S. carn.*, *Streptosporangium carneum* (Mertz et Yao, 1990; Holt *et al.*, 1994).



### 2.3. Identification de l'espèce

Le séquençage de la fraction ribosomique ADN 16S est en accord avec les résultats des études morphologiques et chimiques puisqu'il a permis de confirmer l'identification de l'isolat Sg3 au niveau du genre. Cet isolat n'a pu être rattaché à aucune des espèces connues de *Streptosporangium*. Même si le taux de similitude avec l'espèce *S. carneum* est élevé, il n'est pas significatif sachant que d'autres espèces de *Streptosporangium* ont des taux similaires ou même plus élevés. En effet, le "BLAST" réalisé entre les espèces types prises deux à deux, montre des taux de 99,8 % entre *S. album* et *S. vulgare*, 99,8% entre *S. album* et *S. roseum*, 100% entre *S. roseum* et *S. vulgare*, 98,8 % entre *S. nondiasticum* et *S. pseudovulgare*, et entre *S. longisporum* et *S. amethystogenes*, et 98,6 % entre *S. carneum* et *S. longisporum*. De plus, Stackebrandt et Goebel (1994) rapportent qu'avec un pourcentage d'homologie compris entre 97 et 99%, l'espèce a une très grande probabilité d'être différente. Le dendrogramme montre que l'isolat Sg3 se détache nettement des autres espèces.

Selon les caractères phénotypiques, la distinction des espèces du genre *Streptosporangium* est basée principalement sur la couleur du MA, du MS et des pigments solubles, la taille des sporanges, la forme de spores et quelques caractères physiologiques tels que la croissance à 42°C, la dégradation de l'amidon, la gélatine, l'inositol et le rhamnose, la réduction des nitrates et la production d'iodinine qui se présente sous forme de cristaux violets sur les colonies (Nonomura, 1989). Des tests complémentaires quant à l'utilisation de l'adonitol, l'arabinose, le glycérol, le galactose et le mannitol et d'autres composés sont aussi considérés (Holt *et al.*, 1994).

La comparaison des caractéristiques physiologiques de l'isolat Sg3 avec celles des espèces de référence de *Streptosporangium* indique également que *S. carneum* est la moins différente. Cependant, 15 différences sont enregistrées entre les deux souches

(tableau 11). Ces différences concernent la dégradation de l'esculine, la gélatine, l'amidon, la testostérone, l'arabinose, le cellobiose, la dextrine, le fructose, le galactose, le mannitol, le rhamnose et le xylose, ainsi que la réduction des nitrates et la résistance à la rifampicine et à la vancomycine.

En outre, les hydrolysats cellulaires de *S. carneum* contiennent de l'arabinose en plus de madurose (Mertz et Yao, 1990). Cette espèce est également différente de l'isolat Sg3 par les caractéristiques culturales. Son MA est jaune rosâtre et son MS orange produisant un pigment soluble brun.

Les résultats des études morphologique, chimique et moléculaire ont permis d'identifier l'isolat Sg3 au genre *Streptosporangium*. La comparaison de ses caractéristiques culturales et physiologiques avec celles des espèces de *Streptosporangium*, ainsi que l'analyse phylogénétique montrent clairement que l'isolat Sg3 est une espèce à part. Il représenterait très probablement une nouvelle espèce. Une hybridation ADN-ADN avec *S. carneum* DSM 44125<sup>T</sup> est nécessaire pour confirmer son originalité.

## II. PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES PAR L'ISOLAT SG3

### 1. Résultats

#### 1.1. Mise en évidence de l'activité antibiotique

##### 1.1.1. Mise en évidence en milieu solide

L'activité de l'isolat Sg3 est testée par la méthode des stries croisées. Les résultats sont présentés dans le tableau 12. Cet isolat présente une forte activité contre les deux bactéries à Gram positif testées, mais celles à Gram négatif ne sont pas inhibées. Parmi les levures testées, seules *Rhodotorula mucilaginosa* et *Saccharomyces cerevisiae* sont faiblement inhibées. Une bonne activité est également notée contre certains champignons filamenteux phytopathogènes et toxinogènes.

Tableau 12. Activité antibiotique de l'isolat Sg3.

Microorganismes- tests	Distance d'inhibition (mm)
Bactéries à Gram positif	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	38
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
Bactéries à Gram négatif	0
Champignons filamenteux	
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	14
<i>Botrytis cinerea</i> B354	10
<i>Geotrichum candidum</i> G669	5
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	16
<i>Pythium irregulare</i> PY120	9
<i>Sclerotium sclerotiorum</i> S358	11
Levures	
<i>Candida albicans</i> IPA 200	0
<i>Candida albicans</i> IPA 224	0
<i>Kluyveromyces lactis</i> K231	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> R254	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	8

**Note.** Toutes les bactéries à Gram négatif et les champignons filamenteux suivants ne sont pas inhibées par l'isolat Sg3. Il s'agit de *Agrobacterium tumefaciens* A2410, *A. tumefaciens* biovar 3 A964, *Erwinia amylovora* E1994, *E. carotovora* subsp. *carotovora* E1336, *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* X1119, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas fluorescens* PF11, *Serratia marcescens* SM80, *Aspergillus ochraceus* A3174, *Fusarium culmorum* F3288, *Fusarium graminearum* F5883, *Fusarium sporotrichioides* F 13440, *Fusarium verticilloides* F6442, *Penicillium citrinum* P1843 et *Penicillium verrucosum* P1850.

## 1.1.2. Mise en évidence en milieux liquides

### 1.1.2.1. Milieux synthétiques

Dans les milieux liquides, le milieu synthétique (MS) additionné de glucose ou d'amidon, avec ou sans extrait de levure et CaCO<sub>3</sub>, est comparé au milieu ISP2 (milieu complexe). Trois souches-tests sont utilisées. Il s'agit de *Micrococcus luteus* (bactérie à Gram positif), *Mucor ramannianus* (champignon filamenteux) et *Saccharomyces cerevisiae* (levure). La figure 20 illustre les résultats obtenus et montre que les activités antibactérienne, antifongique et antilevurienne les plus importantes sont obtenues dans le milieu ISP2. Aucune activité n'est décelée dans les milieux ISP4, MS + amidon, MS + amidon + CaCO<sub>3</sub> et MS + glucose. Les milieux ayant montré une activité antibiotique sont : ISP2, MS + glucose + extrait de levure + CaCO<sub>3</sub>, MS + glucose + extrait de levure, MS + glucose + CaCO<sub>3</sub>, MS + amidon + extrait de levure + CaCO<sub>3</sub>, MS + amidon + extrait de levure. Le glucose additionné au milieu synthétique est préféré à l'amidon. L'ajout d'extrait de levure et de CaCO<sub>3</sub> augmente le taux de production d'antibiotiques par rapport à l'ajout d'extrait de levure seul ou de CaCO<sub>3</sub> seul. Il est à signaler qu'un pigment rouge est sécrété dans tous

les milieux où est détectée une activité antibiotique. Le milieu ISP2 a fourni les meilleurs résultats. Il sera comparé avec d'autres milieux complexes.

#### **1.1.2.2. Milieux complexes**

Trois milieux complexes préconisés par les chercheurs pour la production d'antibiotiques par les actinomycètes sont testés en comparaison avec le milieu ISP2. Il s'agit du milieu Bennett, du milieu de Gilpin *et al.* (1995) et celui de Omura *et al.* (1989). Les mêmes microorganismes cibles que précédemment sont utilisés. Les résultats sont représentés par la figure 21. Les activités antibactérienne, antifongique, et antilevurienne sont observées sur les 4 milieux. Nous remarquons que dans les milieux ISP2 et Bennett, les activités antibiotiques évoluent de manière synchrone, mais dans le premier, elles sont légèrement meilleures. Il en est de même, dans les milieux de Gilpin *et al.* et Omura *et al.*, mais où l'activité est moindre. Même si les différences entre les 4 milieux sont réduites, les maxima d'activités sont meilleurs dans le milieu ISP2, lequel a donc été choisi comme milieu de production pour la suite du travail.

### **1.2. Cinétique de production en milieu ISP2**

La cinétique de croissance et de production est réalisée en milieu ISP2 en fioles agitées et en fermenteur. Au cours de la fermentation, la croissance (poids sec de la biomasse), la production d'antibiotiques (méthode de diffusion des puits) et le pH sont mesurés quotidiennement pendant 13 jours. Leur évolution au cours du temps est représentée dans la figure 22.

Le mycélium se présente sous forme de pelotes de couleur rouge brunâtre et de dimension variable, le plus souvent importante (3 à 5 mm de diamètre). Le filtrat de culture est de couleur jaune pâle les 3 premiers jours de fermentation et vire progressivement au rouge jusqu'au rouge brunâtre. Cette couleur rouge est due à un pigment sécrété qui s'est avéré plus tard, doué d'une activité antibiotique. Son évolution est donc également suivie au cours du temps en mesurant la densité optique à 500 nm.

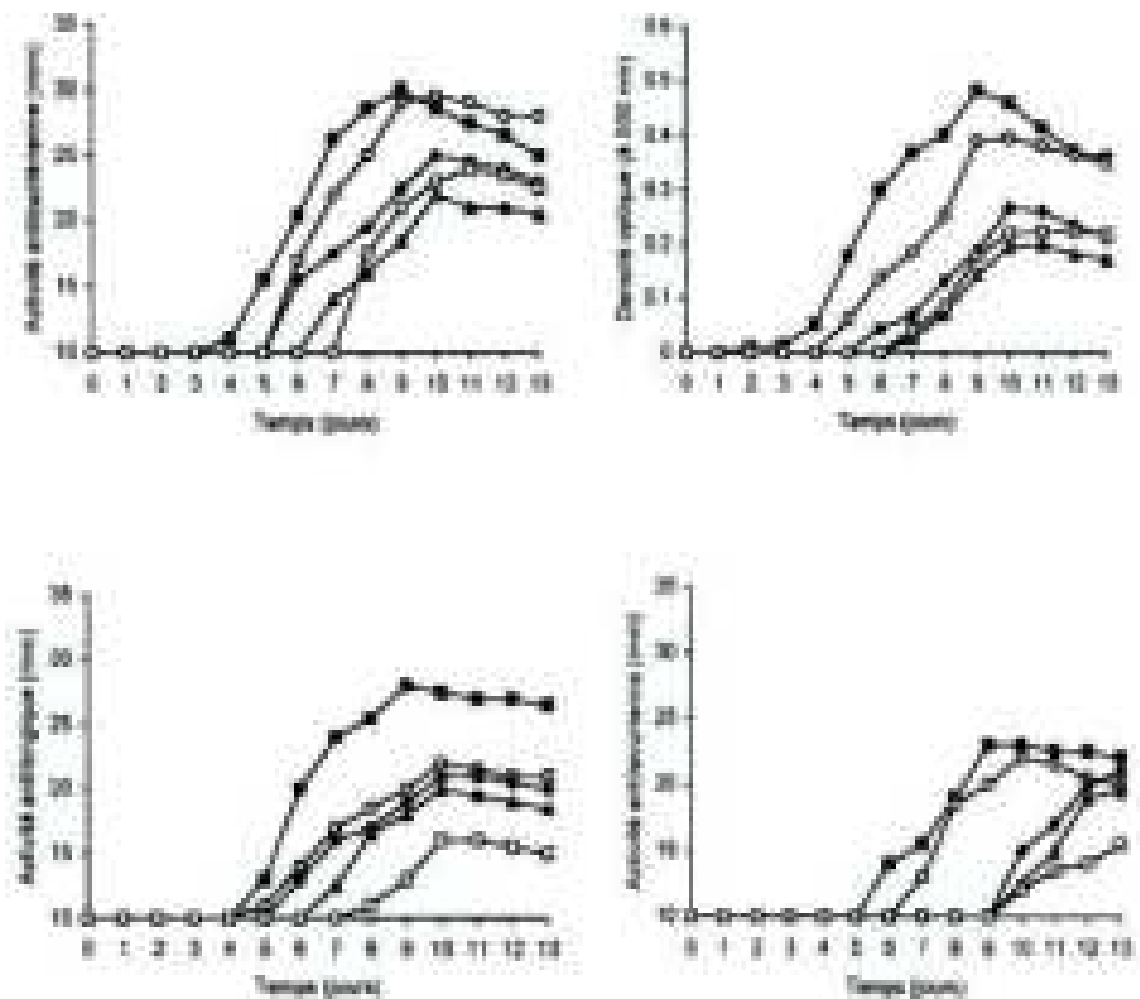


Figure 20. Activités antibactérienne (contre *Micrococcus luteus*), antifongique (contre *Mucor ramannianus*) et antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*) de l'isolat Sg3 en milieux liquides (fioles agitées) ISP2, ISP4 et MS.

**Note.** Les activités antimicrobiennes sont mesurées par la méthode des puits. Le diamètre d'inhibition comprend celui du puits qui est de 10 mm. (■), milieu ISP2 ; (○), MS + glucose + extrait de levure + CaCO<sub>3</sub> ; (□), MS + glucose + extrait de levure ; (▲), MS + glucose + CaCO<sub>3</sub> ; (◻), MS + amidon + extrait de levure + CaCO<sub>3</sub>.

Les milieux ISP4, MS + amidon, MS + amidon + CaCO<sub>3</sub>, MS + glucose n'ayant pas donné d'activités antibiotiques, ne sont pas représentés dans les graphes.

Le graphe montrant l'évolution de la D.O. à 500 nm indique la production du pigment rouge (antibiotiques) par la souche Sg3.

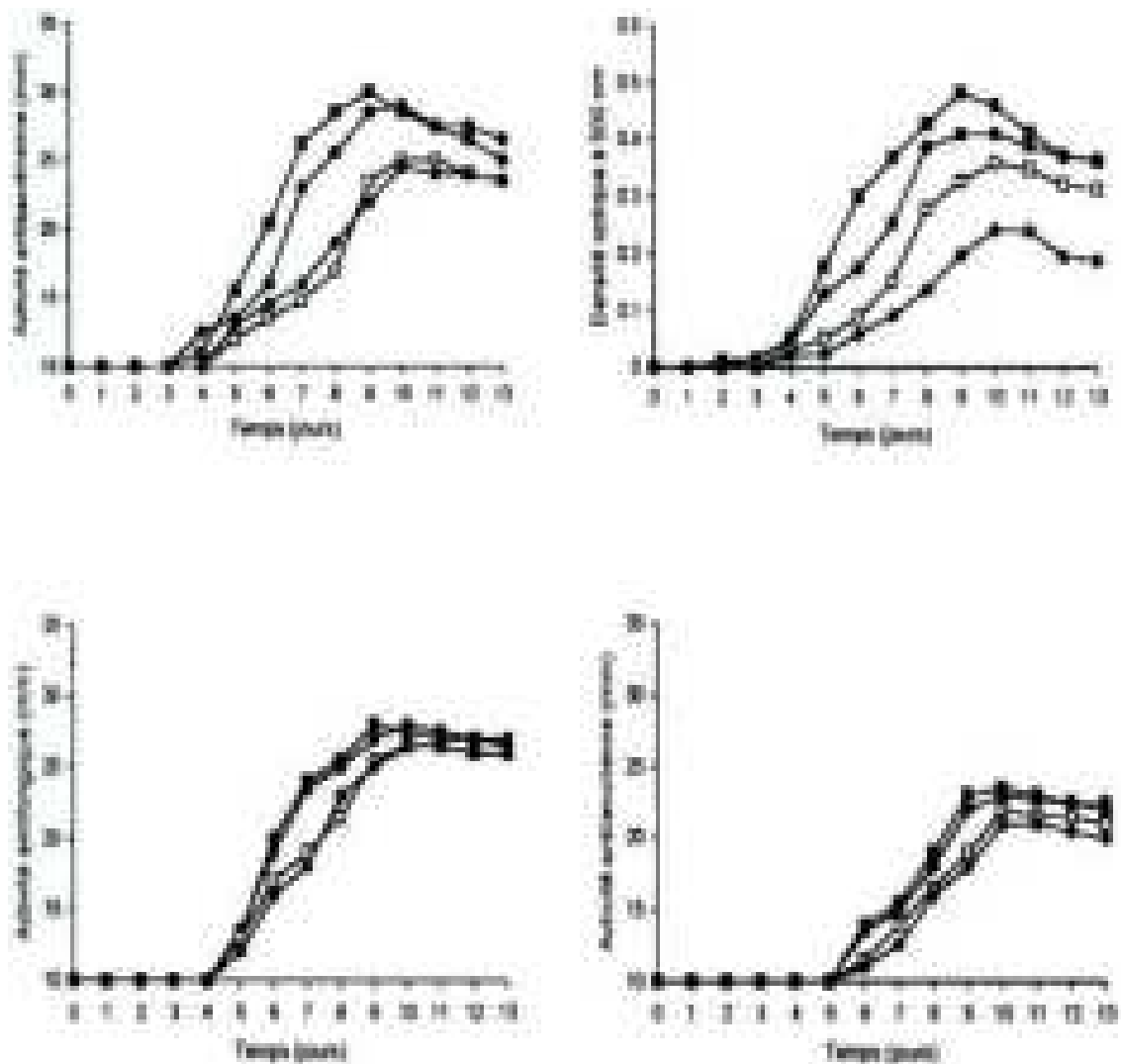


Figure 21. Activité antibactérienne (contre *Micrococcus luteus*), antifongique (contre *Mucor ramannianus*) et antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*) de l'isolat Sg3 en milieux liquides complexes (fioles agitées).

**Note.** les activités sont mesurées par la méthode des puits. Les diamètres d'inhibition tiennent compte de celui des puits qui est de 10 mm. (■), milieu ISP2 ; (●), milieu Bennett ; (□), milieu de Gilpin *et al.*, 1995 ; (○), milieu de Omura *et al.*, 1989.

Le graphe montrant l'évolution de la D.O. à 500 nm indique la production du pigment rouge (antibiotiques) par la souche Sg3.

### 1.2.1. Production en fioles d'Erlenmeyer

Au cours de la cinétique de production en fioles d'Erlenmeyer, les résultats montrent que l'activité antibactérienne apparaît le 4<sup>ème</sup> jour de fermentation. Les activités antifongique et antilevurienne sont détectées le 5<sup>ème</sup> jour. Elles atteignent leurs maxima le 9<sup>ème</sup> jour. L'activité antibactérienne est plus forte que les activités antifongique et antilevurienne. Ces

activités antibiotiques évoluent en corrélation avec la croissance. L'absorbance à 500 nm a pratiquement la même évolution dans le temps que l'activité antibactérienne. Le pH évolue lentement et atteint son maximum (pH 8,44) le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.

### 1.2.2. Production en fermenteur

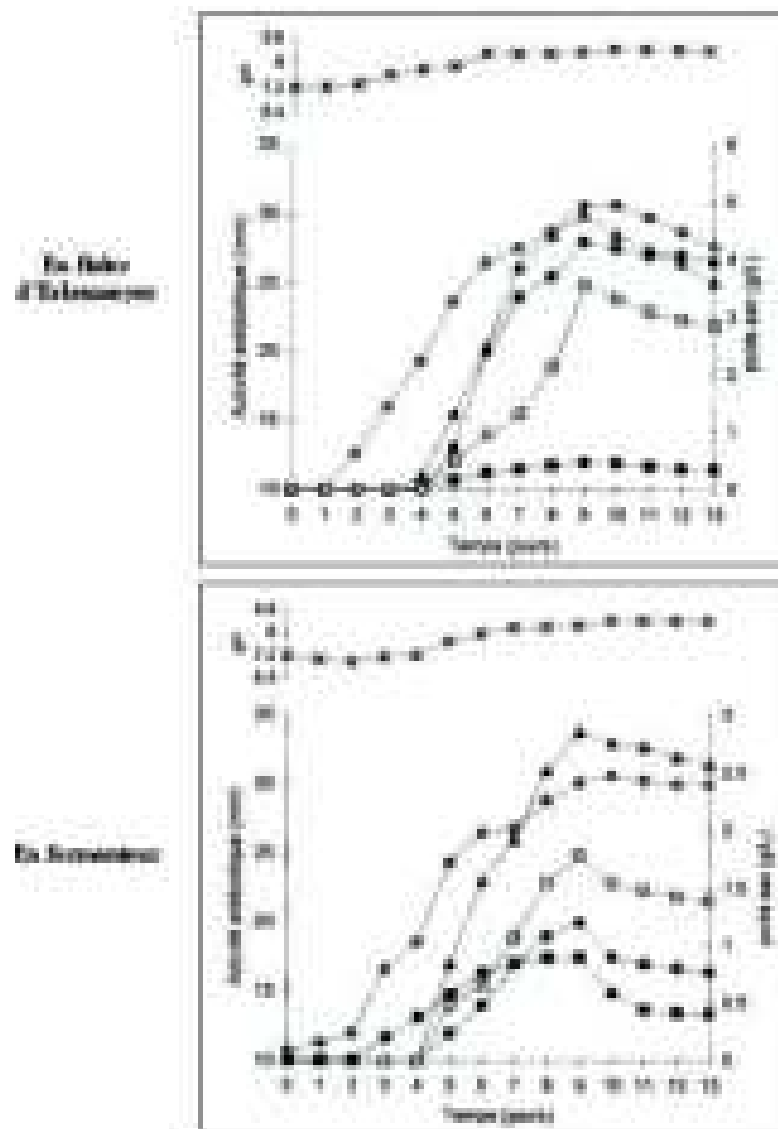
En fermenteur, les activités antibactérienne, antifongique et antilevurienne apparaissent toutes le 5<sup>ème</sup> jour de fermentation et atteignent leurs maxima le 9<sup>ème</sup> jour. Le taux de production d'antibiotiques, la croissance, l'absorbance (à 500 nm) ainsi que le pH évoluent de manière similaire en fioles et en fermenteur. L'activité antibactérienne (méthode des puits et D.O.) est meilleure en fermenteur par rapport aux fioles agitées et ce, contrairement à l'activité antifongique.

## 2. Discussion

L'isolat Sg3 sécrète des antibiotiques antibactériens, antifongiques et antilevuriens. L'activité antibactérienne est dirigée contre les bactéries à Gram positif mais pas contre celles à Gram négatif testées. L'étude du taux de production des antibiotiques a été réalisée dans différents milieux de culture et ce, du point de vue qualitatif surtout. Les milieux favorables à la production d'antibiotiques par l'isolat Sg3 s'avèrent être les milieux contenant du glucose comme source de carbone plutôt que l'amidon. Nous remarquons pour les milieux synthétiques contenant l'amidon, que les activités antibiotiques ne sont détectées que dans ceux additionnés d'extrait de levure. En effet, dans ces mêmes milieux, mais sans extrait de levure, aucune activité n'est mise en évidence. De même, le milieu synthétique ISP4 à base d'amidon et de sels minéraux n'a permis de déceler aucune activité.

Dans les 4 milieux complexes testés, les trois types d'activités antibiotiques sont détectés, mais avec quelques différences. Pour l'activité antibactérienne, la production est meilleure dans l'ISP2, suivi du milieu Bennett, puis des milieux de Omura *et al.* (1989) et de Gilpin *et al.* (1995). Pour les activités antifongiques et antilevurienne, les résultats sont pratiquement similaires dans les 4 milieux. Nous notons cependant, que dans le milieu ISP2, la production est légèrement plus importante. L'activité antibactérienne est meilleure en fermenteur et l'activité antifongique, en fioles agitées, ce qui supposerait que l'on est en présence d'antibiotiques différents. Cette étude a permis de sélectionner le milieu ISP2 comme milieu de production pour la suite du travail.





**Figure 22.** Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques en milieu ISP2 (en fioles d'Erlenmeyer agitées et en fermenteur) de l'isolat Sg3.

**Note.** Les activités antimicrobiennes sont mesurées par la méthode des puits. Le diamètre d'inhibition comprend celui du puits qui est de 10 mm. (▲), activité antibactérienne (contre *Micrococcus luteus*) ; (●), activité antifongique (contre *Mucor ramannianus*) ; (◻), activité antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*) ; (□), poids sec ; (■), densité optique à 500 nm ; (□), pH.

### III. EXTRACTION, DÉTECTION ET PURIFICATION DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT SG3

Un schéma du protocole général suivi est illustré par la figure 23 et ce, pour mieux présenter les différentes étapes d'extraction, de détection, de purification et de caractérisation des antibiotiques de l'isolat Sg3.

#### 1. Résultats

## 1.1. Extraction des antibiotiques

L'extraction a été réalisée à partir du filtrat de culture et à partir du mycélium.

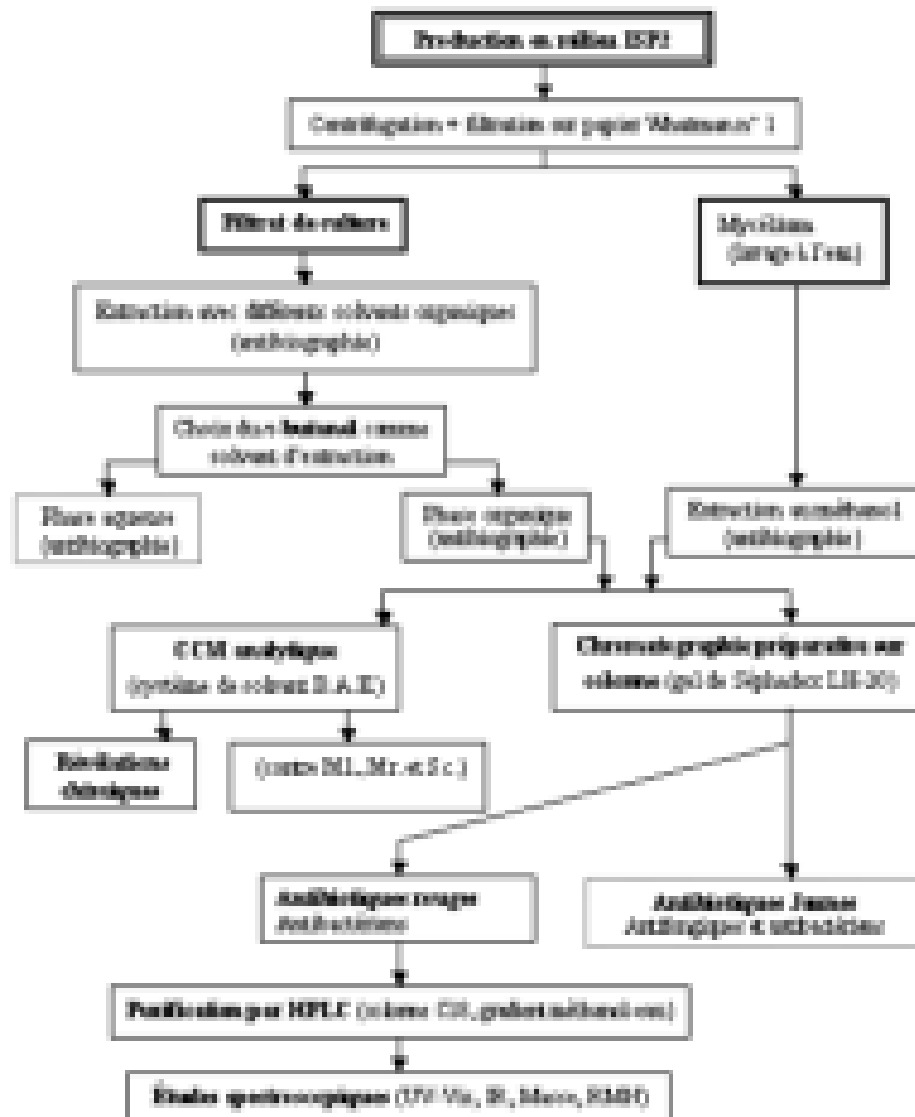
### 1.1.1. Extraction à partir du mycélium

L'extraction des antibiotiques à partir du mycélium est réalisée au méthanol (60 mL de MeOH pour 50 g de mycélium humide et égoutté, provenant de 1 L de culture). L'extrait a une couleur rouge foncé comme la couleur initiale du mycélium. Il présente une très bonne activité contre la bactérie à Gram positif *Micrococcus luteus* (44 mm) et le champignon filamenteux *Mucor ramannianus* (28 mm) et une activité moyenne contre la levure *Saccharomyces cerevisiae* (15 mm). Ce test d'antibiographie a été réalisé par la méthode des disques de papier et le diamètre du disque (6 mm) est compris dans les valeurs indiquées.

### 1.1.2. Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction est effectuée avec 6 solvants organiques de polarités différentes, à savoir, le *n*-hexane, le chloroforme, le benzène, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Une culture (500 mL) de l'isolat Sg3 est réalisée en milieu ISP2 agité. Le filtrat de culture est réparti en 6 fractions de 50 mL extraites chacune avec 50 mL de solvant. Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses et testées pour leur antagonisme par la méthode des disques de papier (60 µL pour *Micrococcus luteus* et *Saccharomyces cerevisiae* et 80 µL pour *Mucor ramannianus*). Les résultats des phases organiques sont illustrés par la figure 24. L'extrait au *n*-butanol est de couleur rouge et est le seul à présenter les 3 types d'activités. Les extraits au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle contiennent des activités contre la bactérie et le champignon. Une faible activité antifongique (11 mm) est notée dans l'extrait à l'hexane. Ni le chloroforme, ni le benzène n'ont extrait les antibiotiques. Pour la suite des études, nous avons donc retenu le *n*-butanol comme solvant d'extraction des activités antibiotiques.

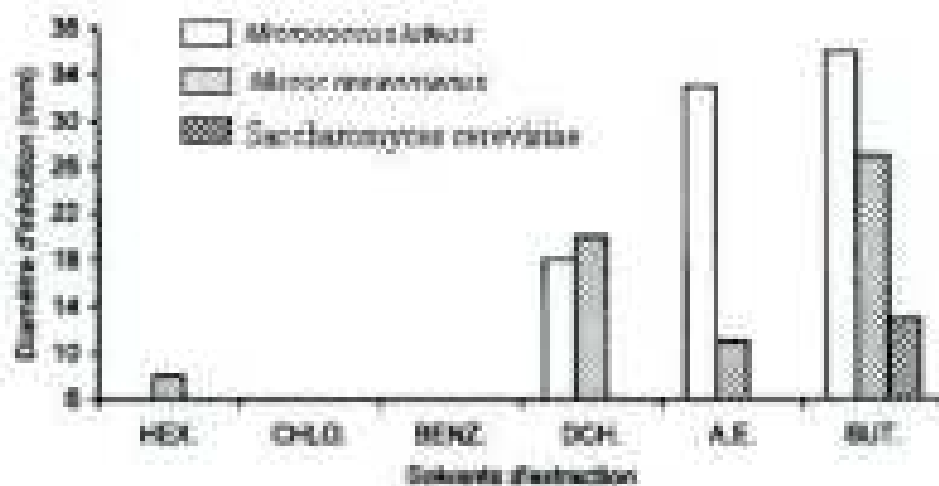
L'activité de la phase aqueuse obtenue après extraction au *n*-butanol a été mesurée par la méthode de diffusion des puits (10 mm de diamètre) car celle des disques de papier ne convient pas pour un extrait aqueux. Elle présente une puissante activité contre *Micrococcus luteus* (48 mm) et *Mucor ramannianus* (40 mm) mais aucune activité contre la levure. Celle-ci est contenue dans la phase butanolique uniquement .



**Figure 23.** Protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques de l'isolat Sg3.

Les antibiotiques de la phase aqueuse et les jaunes de la phase organique n'ont pas fait l'objet de purification par HPLC et de caractérisation spectroscopique.

B.A.E., *n*-butanol - acide acétique - eau; M.L., *Micrococcus luteus*; M.r., *Mucor ramannianus*; S.c., *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figure 24.** Activités des extraits du filtrat de culture de l'isolat Sg3 par différents solvants organiques.

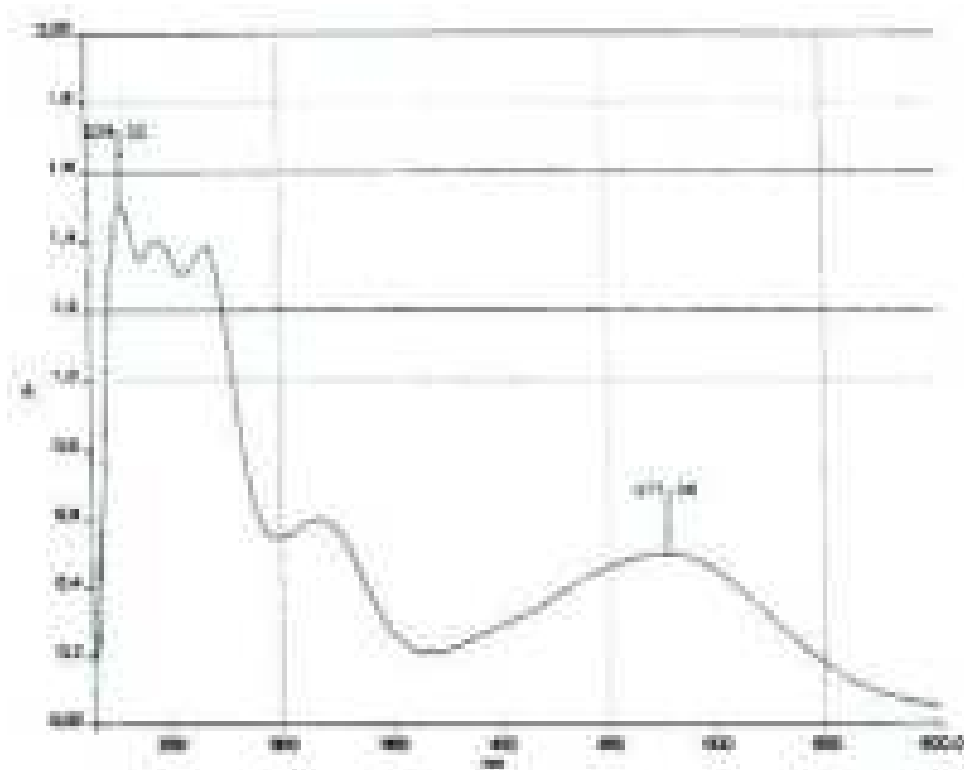
**Note :** HEX., *n*-hexane ; CHLO., chloroforme ; BENZ., benzène ; DCH., dichlorométhane ; A.E., acétate d'éthyle ; BUT., *n*-butanol. Le diamètre du disque (6 mm) est inclus dans les valeurs des diamètres d'inhibition.

### 1.2. Recherche des polyènes dans les extraits bruts organique et aqueux

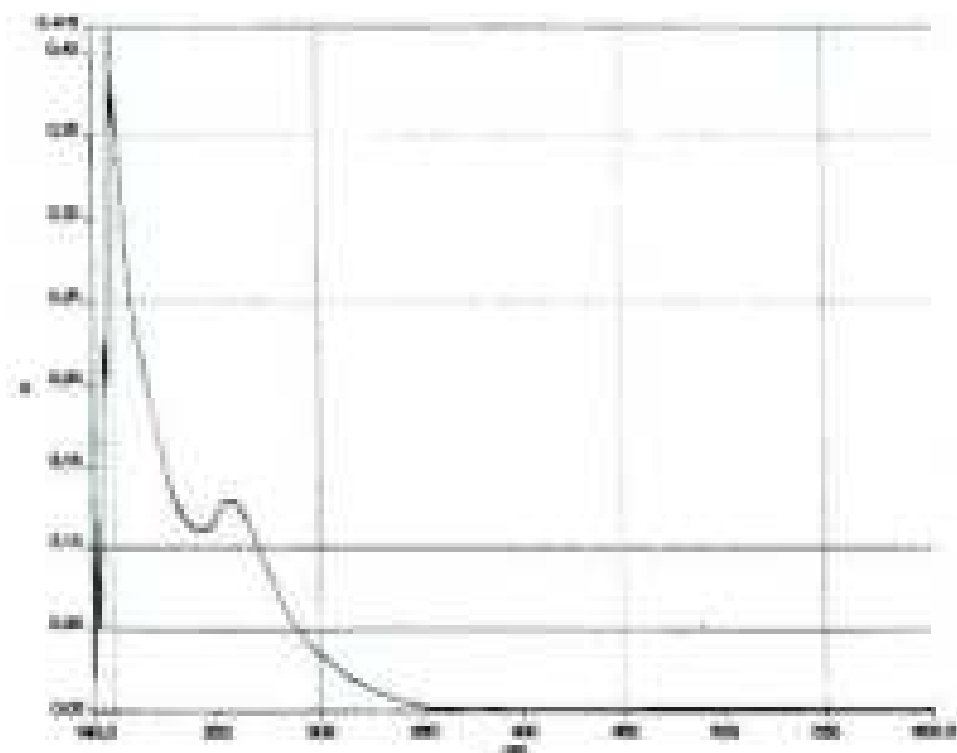
Les spectres d'absorption dans l'UV-visible des extraits bruts des phases organique (butanolique) et aqueuse et du mycélium sont représentés dans la figure 25. Ces spectres n'ont pas montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes, ce qui montre que les activités antibiotiques ne sont pas de nature polyénique. Les maxima d'absorption sont notés à 228, 320 et à 477 nm pour l'extrait butanolique, à 228 et 255 nm pour l'extrait aqueux et à 205, 320 et 464 nm pour l'extrait méthanolique du mycélium.

### 1.3. Détection des antibiotiques par bioautographie

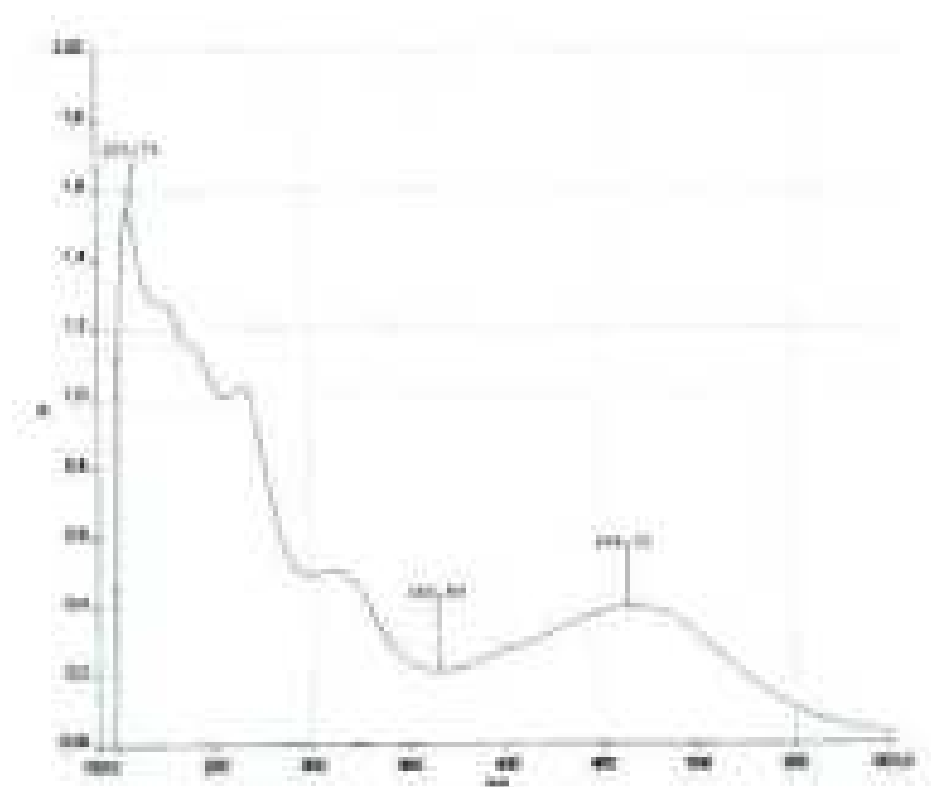
Après extraction au *n*-butanol, la phase organique est analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice G60. Les antibiotiques sont détectés par bioautographie contre *Micrococcus luteus* et *Mucor ramannianus*. Deux systèmes de solvants sont testés. Dans le système de solvant B.A.E. (*n*-butanol – acide acétique – eau, 3:1:1, v/v), trois antibiotiques à activité antibactérienne et antifongique sont détectés (figure 26). Ils sont désignés Sg3A ( $R_f = 0,88$ ), Sg3B ( $R_f = 0,70$ ) et Sg3C ( $R_f = 0,51$ ) et possèdent chacun une forte activité antibactérienne et antifongique forte et moyenne respectivement. Sg3A est de couleur jaune, Sg3B est rouge brunâtre et Sg3C rouge. L'activité antibactérienne des 3 taches est importante. Par contre dans le système de solvant A.M. (acétate d'éthyle-méthanol, 100:15, v/v), la migration est mauvaise. Sg3A migre peu ( $R_f = 0,18$ ) et les 2 autres ne migrent pas.



**Figure 25a.** Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'extrait butanolique brut de la phase organique de l'isolat Sg3



**Figure 25b.** Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'extrait aqueux brut (après extraction au n-butanol) de l'isolat Sg3.



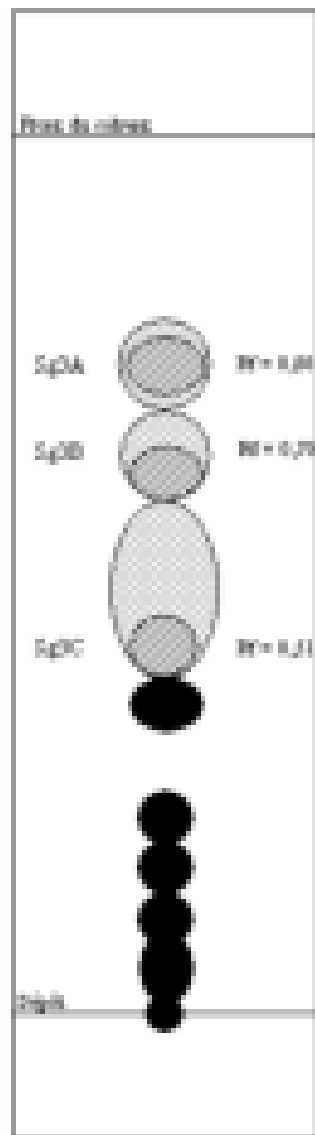
**Figure 25c.** Spectre d'absorption dans l'UV-visible de l'extrait méthanolique du mycélium de l'isolat Sg3.

#### 1.4. Détection des antibiotiques par révélations chimiques

L'antibiotique Sg3A est révélé uniquement par le naphtorésorcinol (rose-violacé) et la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (gris violacé). Les réactions avec la ninhydrine, le formaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la nitro-4-aniline et le chlorure de fer ferrique sont négatives. Sg3B et Sg3C ne sont révélés par aucun des réactifs utilisés, ceci en raison probablement de leurs couleurs naturelles rouge brunâtre et rouge qui auraient masqué celles des réactifs utilisés.

#### 1.5. Purification des antibiotiques

Vingt litres de filtrat de culture sont extraits au *n*-butanol au jour optimal de production (9<sup>ème</sup> jour). Les antibiotiques de la phase butanolique sont purifiés par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex LH-20 puis par HPLC.



**Figure 26.** Localisation des activités antibiotiques par bioautographie de l'extrait organique. Système de solvant : *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1 en volumes). , tache active contre *Micrococcus luteus* ; , tache active contre *Mucor ramannianus* ; , tache inactive.

### 1.5.1. Semi-purification par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex LH-20

L'extrait butanolique brut concentré est repris dans du méthanol et semi-purifié par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex LH-20, en mode isocratique à 75% de méthanol-eau. Cette phase mobile a été choisie après des expériences préliminaires avec des gradients discontinus, normal et inverse de méthanol-eau et en isocratique à différents pourcentages de méthanol-eau. Trois bandes actives distinctes par leurs couleurs (jaune, rouge brunâtre et rouge) sont éluées et récupérées séparément. Les 3 bandes présentent chacune une activité antibactérienne forte et antifongique moyenne. La troisième, la rouge,

possède en plus une activité antilevurienne moyenne. Les résultats d'activité des différentes bandes sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13. Activités des différentes bandes obtenues par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex LH-20 (isocratique à 75%).

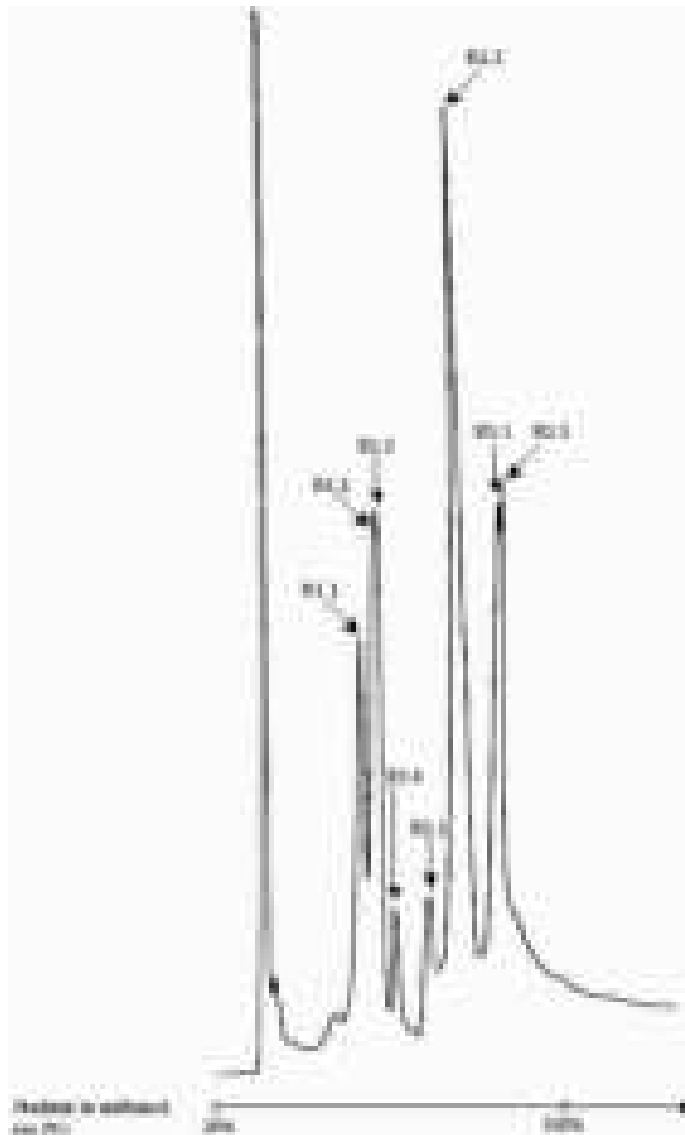
Bandes (Couleur et désignation)	Diamètre d'inhibition (mm)		
	<i>M. luteus</i>	<i>M. ramannianus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Bande 1: incolore	0	0	0
Bande 2: jaune	31	17	0
Bande 3: rouge brunâtre	38	10	0
Bande 4: rouge	40	10	15
Bande 5: incolore	0	0	0

**Note.** Antibiographie par la méthode des disques de papier (6 mm de diamètre, 80 µL/disque). Le diamètre du disque est inclus dans les valeurs des diamètres d'inhibition.

### 1.5.2. Purification par HPLC

La purification par HPLC n'a été poursuivie que pour la bande rouge. Les premières analyses HPLC de l'extrait jaune de la phase organique et celui de la phase aqueuse indiquent qu'ils sont très polaires et difficilement purifiables (résultats non présentés). Ils ont été concentrés à sec et stockés à -32°C. La bande rouge est concentrée à sec, reprise dans du méthanol puis injectée en HPLC (colonne C18 Uptisphere UP5ODB, 250 × 7.8 mm, Interchim). Des expériences préliminaires ont été nécessaires pour rechercher les conditions optimales de séparation et nous ont permis de retenir le programme suivant pour la première injection : gradient continu (courbe convexe) de 20 à 100% méthanol/eau pendant 40 min (débit 1,2 mL/min). L'analyse par antibiographie des pics collectés séparément montre la présence de 8 pics actifs de couleur rouge (figure 27). Ils forment en fait trois (3) complexes d'antibiotiques et sont désignés par ordre d'élution, R1, R2 et R3. Le complexe R1 est composé de 4 antibiotiques très proches entre eux (R1.1, R1.2, R1.3 et R1.4). Les complexes R2 et R3 sont composés chacun de deux antibiotiques





**Figure 27.** Profil d'élution en HPLC de la première injection de la fraction antibiotique rouge semi-pure solubilisée dans du méthanol.

Colonne C18 semipréparative (5 $\mu$ ), gradient continu de 20 à 100% de méthanol-eau, détection à 220 nm. Débit : 1,2 mL/min.

(R2.1 et R2.2 ; R3.1 et R3.2) également très proches entre eux. L'antibiotique R2.2 est majoritaire du point de vue quantitatif.

La purification finale a été poursuivie pour les 8 produits (4 à 5 réinjections chacun).

### 1.5.3. Activités antimicrobiennes des produits semi-purs

Les activités antimicrobiennes ont été effectuées par la méthode de diffusion des disques de papier (6 mm de diamètre) pour les 8 antibiotiques semi-purs (issus de la première injection en HPLC). Les extraits sont concentrés à sec puis repris dans du méthanol et spotés à raison de 80  $\mu$ g par disque. Les microorganismes-tests utilisés et les résultats du test sont

présentés dans le tableau 14. Les milieux de culture utilisés sont la gélose nutritive pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour les champignons et les levures.

Tableau 14. Activités antimicrobiennes des antibiotiques rouges semipurs.

Microorganismes-tests	Antibiotiques							
	R1.1	R1.2	R1.3	R1.4	R2.1	R2.2	R3.1	R3.2
<b>Bactéries à Gram positif</b>								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	20	24	26	10	18	28	30	34
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16	19	18	9	14	22	22,5	26
<i>Bacillus coagulans</i>	19	18,5	18	13	17	17,5	19	19,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	7	7	7	8	8	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	8	8	8	7	7	10	10	10
<b>Levures</b>								
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	7	8	8	7	7,5	10	33	35
<i>Candida albicans</i> IPA 224	7	7	7	7	8	8	8	8

**Note.** Les valeurs représentent le diamètre d'inhibition (mm) et comprennent celui du disque qui est de 6 mm. Chaque disque contient 80 µg d'antibiotique.

Les activités sont négatives pour les bactéries à Gram négatif testées (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), pour les champignons filamenteux (*Aspergillus carbonarius* M333, *Mucor ramannianus* NRRL 1829, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Aspergillus flavus*) et pour *Listeria monocytogenes* (bactérie à Gram positif).

Les résultats indiquent que les 8 molécules présentent une activité contre les bactéries à Gram positif testées, excepté *Listeria monocytogenes* qui n'a pas été inhibée. Aucune activité n'est enregistrée contre les bactéries à Gram négatif et les champignons filamenteux testés. Une activité puissante (35 mm) contre *Saccharomyces cerevisiae* est notée pour les antibiotiques R3.1 et R3.2, et faible pour les R1 et les R2. La levure *Candida albicans*, pathogène pour l'homme, est faiblement inhibée.

Nous remarquons que l'antibiotique R2.2 (majoritairement produit par la souche) est moins actif que les R3. En effet, ceux-ci ont présenté les meilleures activités. Les activités des R2 et R1 sont presque similaires avec cependant, des résultats légèrement supérieurs pour R2.2 contre certaines bactéries et les levures.

## 2. Discussion

L'isolat Sg3 sécrète plusieurs antibiotiques, ceux extraits par le *n*-butanol (les jaunes, les rouges brunâtres et les rouges) et ceux de la phase aqueuse. Les activités antibiotiques ont été détectées dans le filtrat de culture et dans le mycélium. Les premières analyses HPLC de la bande jaune de la phase organique et celle de la phase aqueuse indiquent qu'ils sont très polaires. La bioautographie de la phase organique butanolique a montré la présence de 3 taches présentant chacune une activité antibactérienne et antifongique. L'analyse spectrophotométrique des extraits butanoliques et aqueux indique que nos molécules ne sont pas de nature polyénique (Martin, 1979; Dinya et Sztaricskai, 1986). Ce fait est important car les polyènes sont connus pour leur toxicité et leur instabilité et sont actuellement éliminés des programmes de recherche de nouveaux antifongiques. La première analyse par HPLC de la bande rouge semipure, révèle la présence de 3 complexes

---

composés de 8 antibiotiques actifs, de couleur rouge pour lesquels la purification a été poursuivie jusqu'à l'état pur. La caractérisation spectroscopique n'a été effectuée que pour ces antibiotiques rouges.

## **IV. CARACTÉRISATION SPECTROSCOPIQUE DES ANTIBIOTIQUES R1, R2 ET R3**

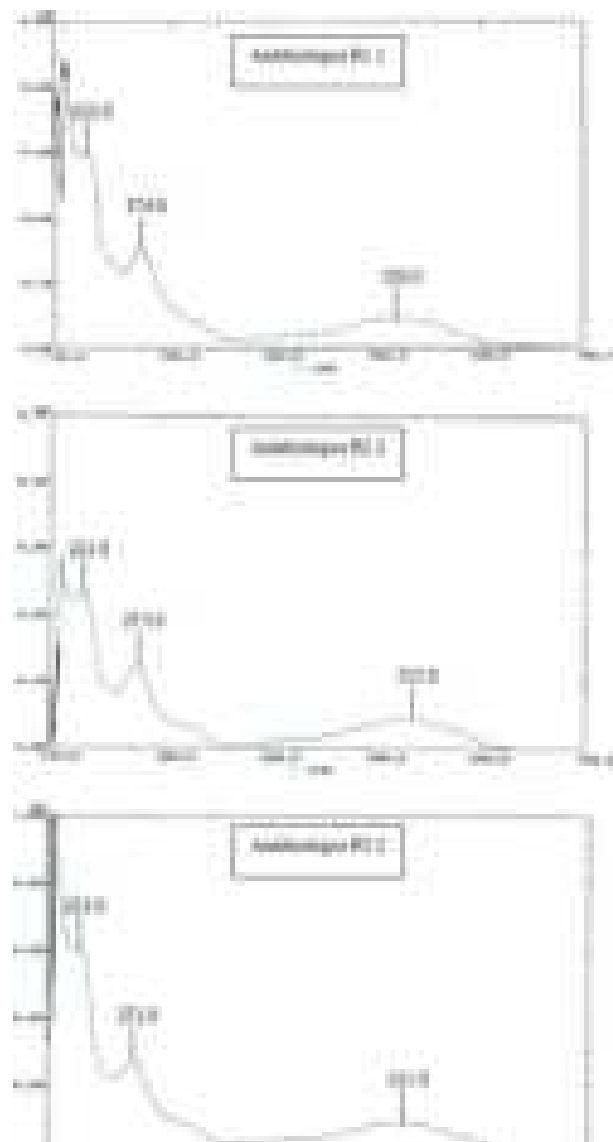
### **1. Résultats**

#### **1.1. Spectroscopie UV-visible**

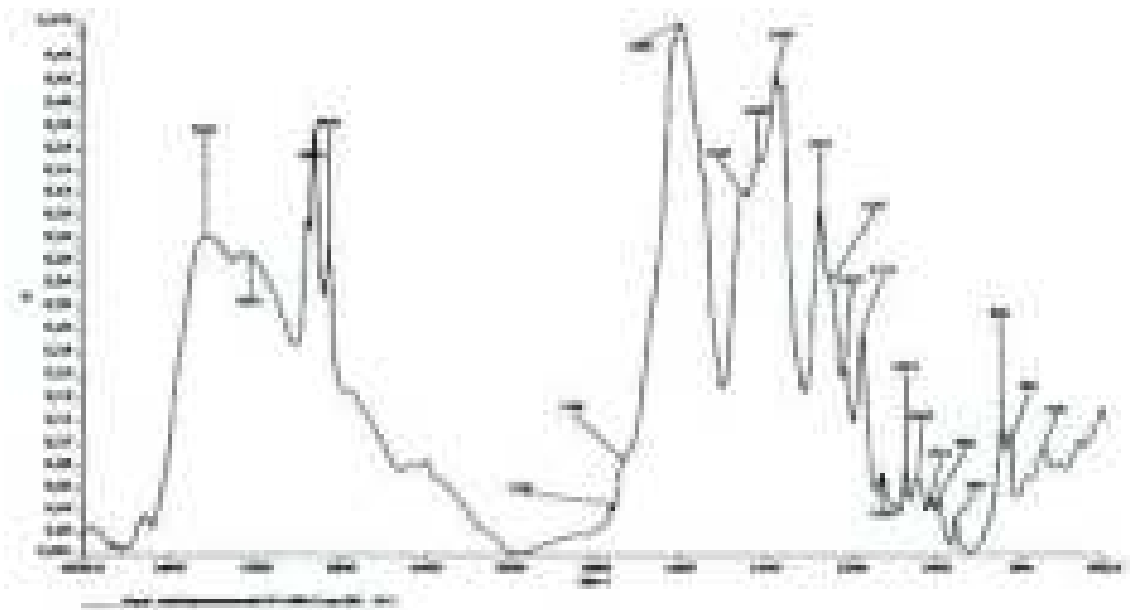
Les spectres UV-visible des trois antibiotiques R1.1, R2.2 et R3.2 purs présentent une certaine similarité entre eux, et n'ont pas montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes (figure 28). L'antibiotique R1.1 absorbe à 222, 274 et 520 nm, R2.2 absorbe à 222, 273 et 535 nm, et R3.2 à 222, 272 et 525 nm. Les trois antibiotiques présentent aussi un épaulement aux environs de 325 nm. L'absorption entre 400 et 500 nm est assignée à la présence d'un chromophore, qui est responsable de la couleur rouge des antibiotiques suggérant la présence d'un noyau type quinone. Ces produits sont rouges à pH neutre, mais deviennent bleu-violet à pH basique et jaune à pH acide, tout comme nos antibiotiques.

#### **1.2. Spectroscopie infrarouge**

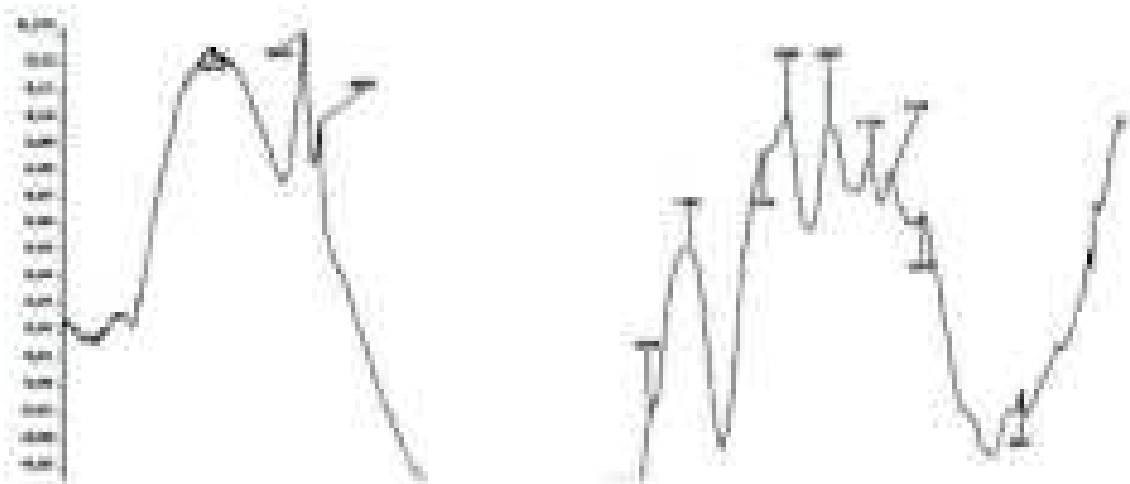
Les spectres d'absorption en infrarouge ont été réalisés pour les huit antibiotiques purs R1.1, R1.2, R1.3 et R1.4, R2.1 et R2.2 et R3.1 et R3.2. Ils sont présentés dans les figures 29a-h. Les huit molécules présentent en commun les bandes d'absorption et les fonctions correspondantes mentionnées dans le tableau 15.



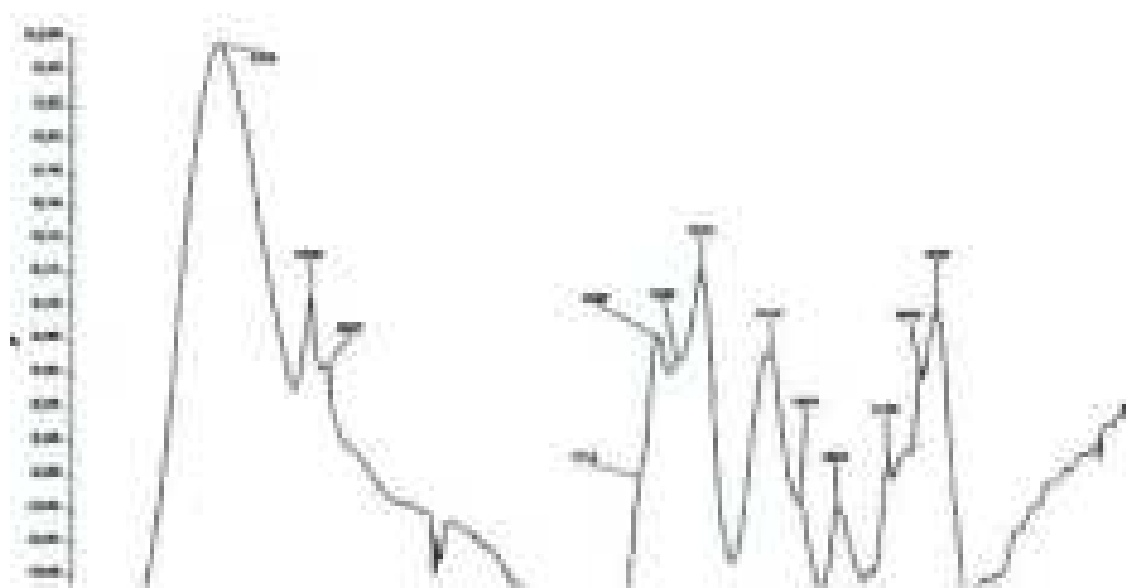
**Figure 28.** Spectres d'absorption dans l'UV-visible des antibiotiques R1.1, R2.2 et R3.2 (dissouts dans du méthanol).



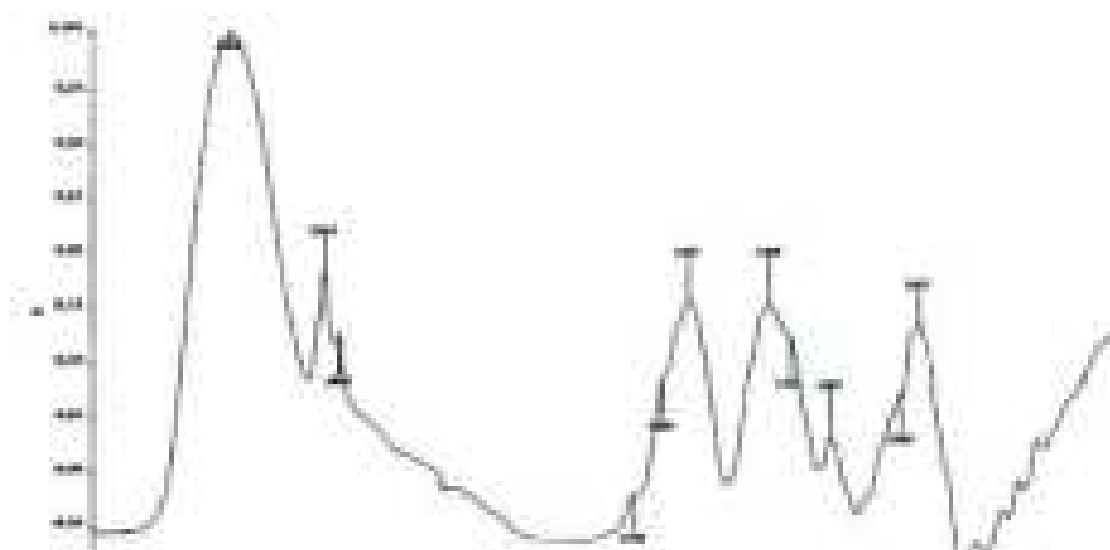
**Figure 29a.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique R1.1.



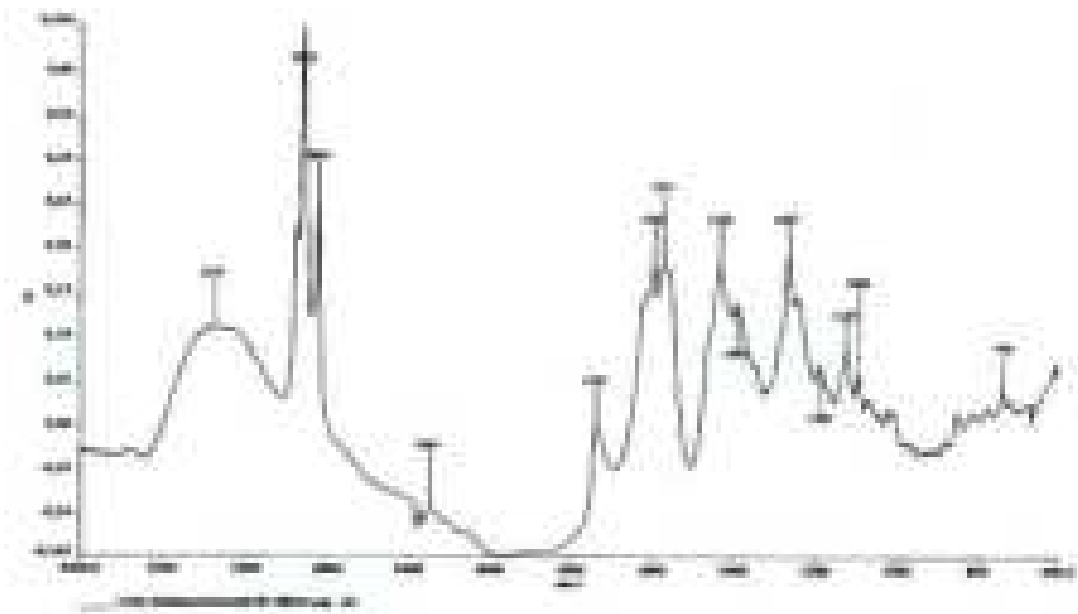
**Figure 29b.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique R1.2.



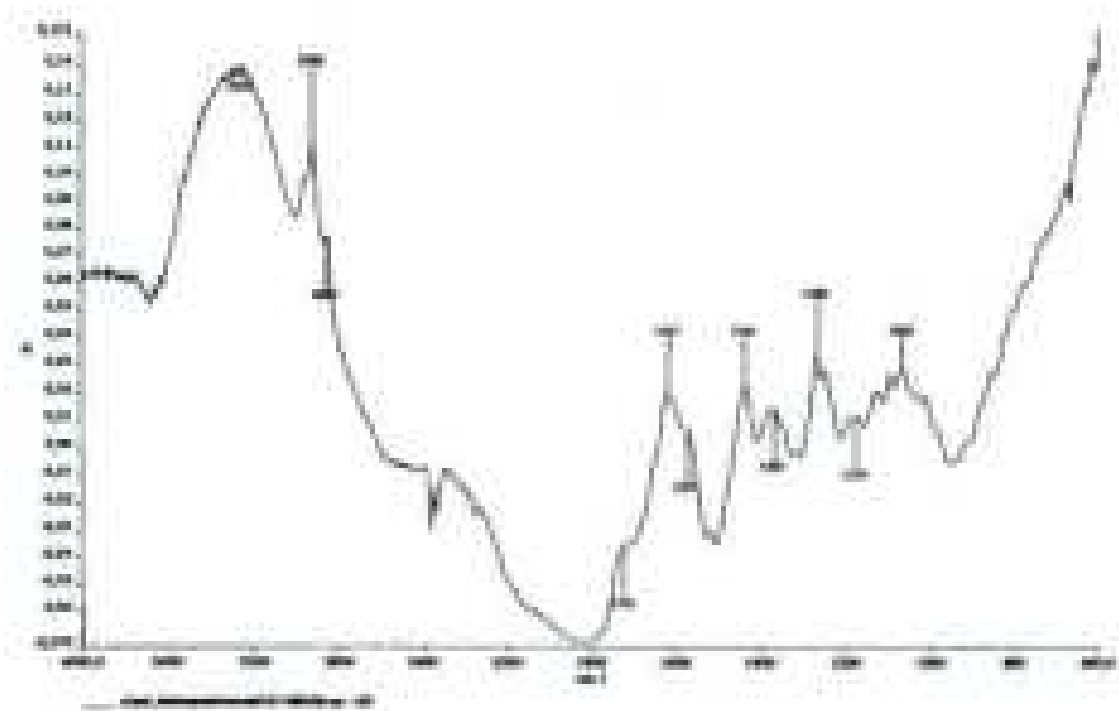
**Figure 29c.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique R1.3.



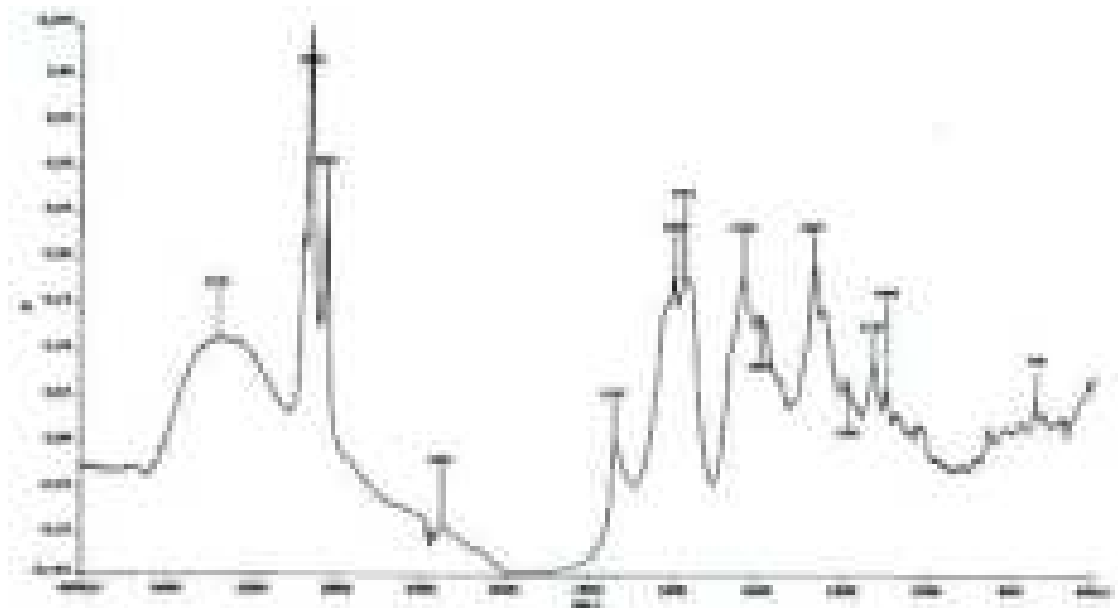
**Figure 29d.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique R1.4.



**Figure 29e.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique R2.1.



**Figure 29g.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique R3.1.



**Figure 29h.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique R3.2.

Ces spectres montrent des bandes caractéristiques d'unités hydroxyles (bandes entre  $3525$  et  $3225\text{ cm}^{-1}$ ) et méthyles (entre  $2950$  et  $2850\text{ cm}^{-1}$ ), de groupements carbonyles (à  $1723\text{ cm}^{-1}$ ) et d'une structure aromatique (à  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) (dont un cycle benzénique) avec très probablement une fonction cétone attaché à cette structure (= quinone).

Tableau 15. Fréquences et intensités d'absorption dans l'infrarouge (en  $\text{cm}^{-1}$ ) des antibiotiques R1, R2 et R3.



Tableau 15. Fréquences et intensités d'absorption dans l'infrarouge (en $\text{cm}^{-1}$ ) des antibiotiques R1, R2 et R3.								Fonction
Antibiotiques								
R1.1	R1.2	R1.3	R1.4	R2.1	R2.2	R3.1	R3.2	
3431	3333	3339	3366	3358	3259	3357	3401	O-H (hydroxyle)
1420	1412	1414	1409	1434	1434	1432	1431	CH du CH, du $\text{CH}_2$ et/ou du $\text{CH}_3$
1377	1360	1347	1361	1384	1367	1391	1378	O-H (hydroxyle)
1271	1267	1264	1267	1267	1266	1267	1264	O-H (hydroxyle)
1129	1123	1124	NA	1127	1124	1127	1127	O-H (hydroxyle)
1043	1055	1039	1057	1044	1045	1051	1053	O-H (hydroxyle)
2946	2948	2940	2940	2940	2949	2944	2948	CH, $\text{CH}_2$ et/ou $\text{CH}_3$
2924	2924	2926	2924	2925	2926	2923	2926	CH du CH, du $\text{CH}_2$ et/ou du $\text{CH}_3$
2853	2853	2853	2853	2853	2860	2852	2854	CH du CH, du $\text{CH}_2$ et/ou du $\text{CH}_3$
1736	1738	1711	1728	1731	1721	1737	1734	COOH (carboxyle) ou C=O (cétone)
NA	1670	1666	1660	NA	1660	NA	NA	Cycles aromatiques avec fonction cétone
1600	NA	1626	1611	1612	1617	1596	1619	Cycles aromatiques
1455	1581	1572	1597	1560	1571	1571	1571	C=C liaison de cycles aromatiques
846	NA	NA	NA	851	NA	NA	NA	Cycle benzénique
824	827	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Cycle benzénique
749	NA	NA	NA	NA	NA	740	740	Cycle benzénique

NA : bande non apparente (probablement masquée par une autre bande).

### 1.3. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse réalisés par "nano-electrospray ionisation" (mode négatif) sont illustrés dans les figures 30a~h et indiquent une masse de 462 pour chacun des antibiotiques du complexe R1, 476 pour chacun des R2 et 490 pour les deux R3. Une différence de masse de 14, correspondant à un groupement méthyle est notée.



Figure 30a. Spectre de masse du produit R1.1 (méthode Nano ESI).



Figure 30b. Spectre de masse du produit R1.2 (méthode Nano ESI).



Figure 30c. Spectre de masse du produit R1.3 (méthode Nano ESI).



Figure 30d. Spectre de masse du produit R1.4 (méthode Nano ESI).



Figure 30e. Spectre de masse du produit R2.1 (méthode Nano ESI).



**Figure 30f.** Spectre de masse du produit R2.2 (méthode Nano ESI).



**Figure 30g.** Spectre de masse du produit R3.1 (méthode Nano ESI).



**Figure 30h.** Spectre de masse du produit R3.2 (méthode Nano ESI).

#### 1.4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN du proton sont réalisés pour les composés R1.4, R2.1, R2.2, R3.1 et R3.2, et celui du carbone 13 uniquement pour le produit majoritaire R2.2.

##### 1.4.1. RMN du proton

Les spectres RMN du proton sont illustrés par les figures 31a~f. L'analyse du spectre  $^1\text{H}$  RMN de l'antibiotique R2.2 (figures 31c et 31d) montre les signaux :

d'un  $\text{CH}_3$  à  $\delta = 1,32$  ppm, 3 H, t.

d'un autre  $\text{CH}_3$  à  $\delta = 2,70$  ppm, 3 H, t.

d'un  $\text{CH}_2$  à  $\delta = 2,83$  ppm, 2 H, q.

de trois protons à  $\delta = 4,37$  ppm, à 4,44 ppm et à 7,02 ppm, s, 1 H.

de protons aromatiques d'un cycle orthosubstitué à  $\delta = 7,66$  ppm, d, 1 H et à  $\delta = 7,82$  ppm, d, 1 H.

d'un H à  $\delta = 8,24$  ppm, s, 1 H.

d'un H à  $\delta = 13,08$  ppm, s, 1 H mobile (OH ? N ?).

d'un COOH à  $\delta = 13,98$  ppm, s, 1H.

d'un H à  $\delta = 17,64$  ppm, s, 1H (ou COOH ?).

Les spectres  $^1\text{H}$  RMN des 5 molécules sont proches entre eux, ils présentent les signaux communs d'une structure aromatique avec un  $\text{CH}_2$ , deux  $\text{CH}_3$  et un COOH.

#### 1.4.2. RMN du carbone 13

La RMN du carbone 13 a été réalisée pour le composé R2.2. Le spectre  $^{13}\text{C}$  (figure 32) indique la présence de 26 carbones. La molécule présente les signaux suivants :

Les signaux à 12,4 et 22,6 ppm indiquent la présence de 2 groupements  $\text{CH}_3$ .

Le signal à 22,6 ppm est attribué à un  $\text{CH}_2$ .

Les signaux entre 29 et 48 ppm indiquent la présence de CH.

Les signaux à 72,5 et à 73,0 ppm correspondent à 2 carbones d'un cycle aromatique.

Les signaux entre 114 et 118 ppm indiquent la présence d'un cycle aromatique.

Les signaux entre 131 et 132 ppm indiquent la présence d'un autre cycle aromatique.

Le signal à 135,3 ppm correspond à 1 carbone d'un cycle aromatique.

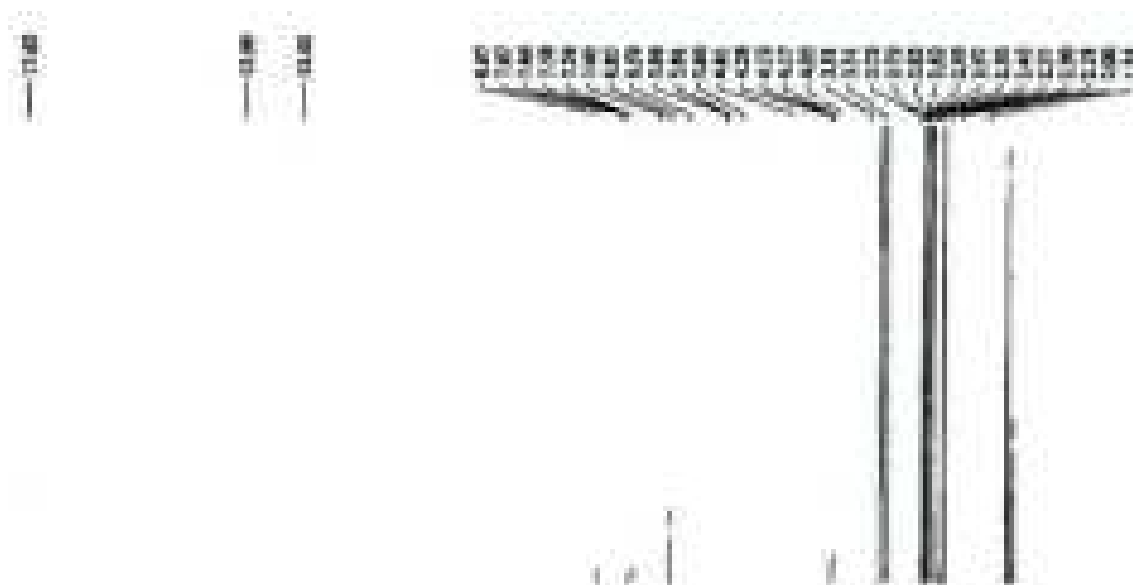
Les signaux entre 139 et 143 ppm indiquent la présence d'un 3ème cycle aromatique.

Le signal à 147,4 ppm correspond à 1 carbone d'un cycle aromatique.

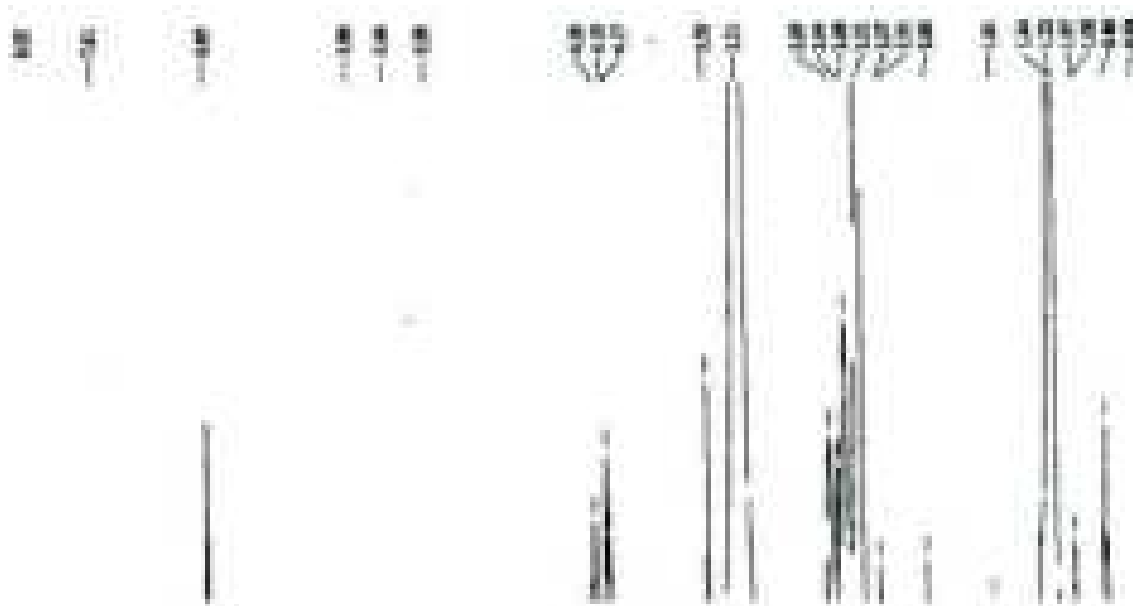
Les signaux entre 158 et 160 ppm indiquent la présence d'un 4ème cycle aromatique.

Le signal à 174,3 ppm correspond à 1 carbone d'un carbonyle d'un groupement COOH collé à un 5<sup>ème</sup> cycle aromatique.

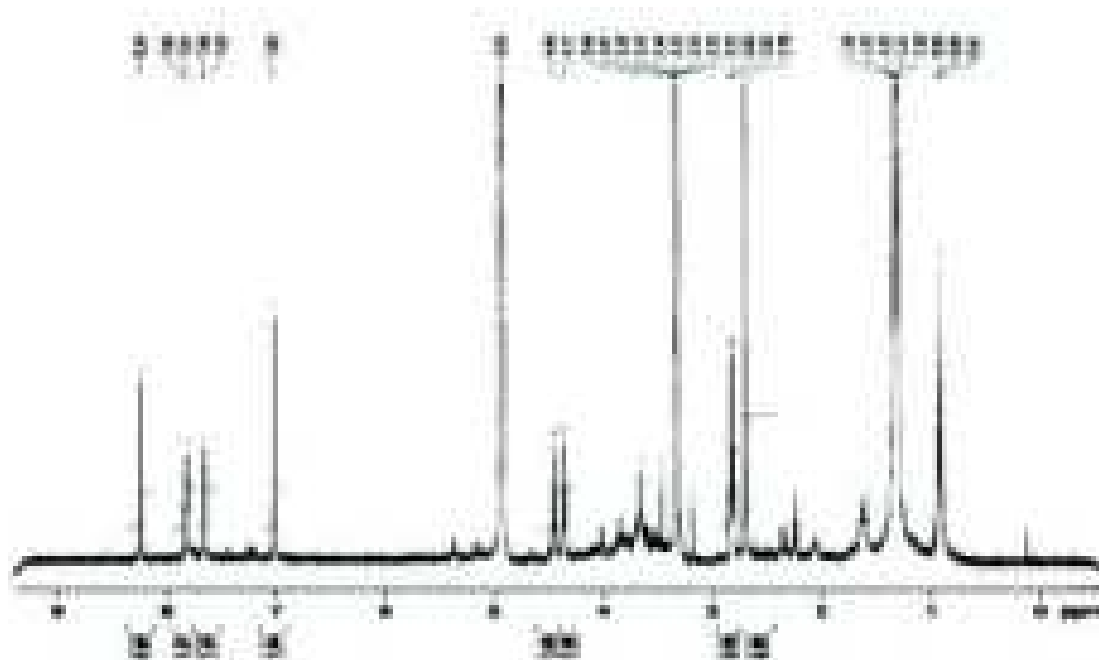
Les signaux entre 186 et 188 ppm indiquent la présence d'un cycle aromatique avec 2 C=O.



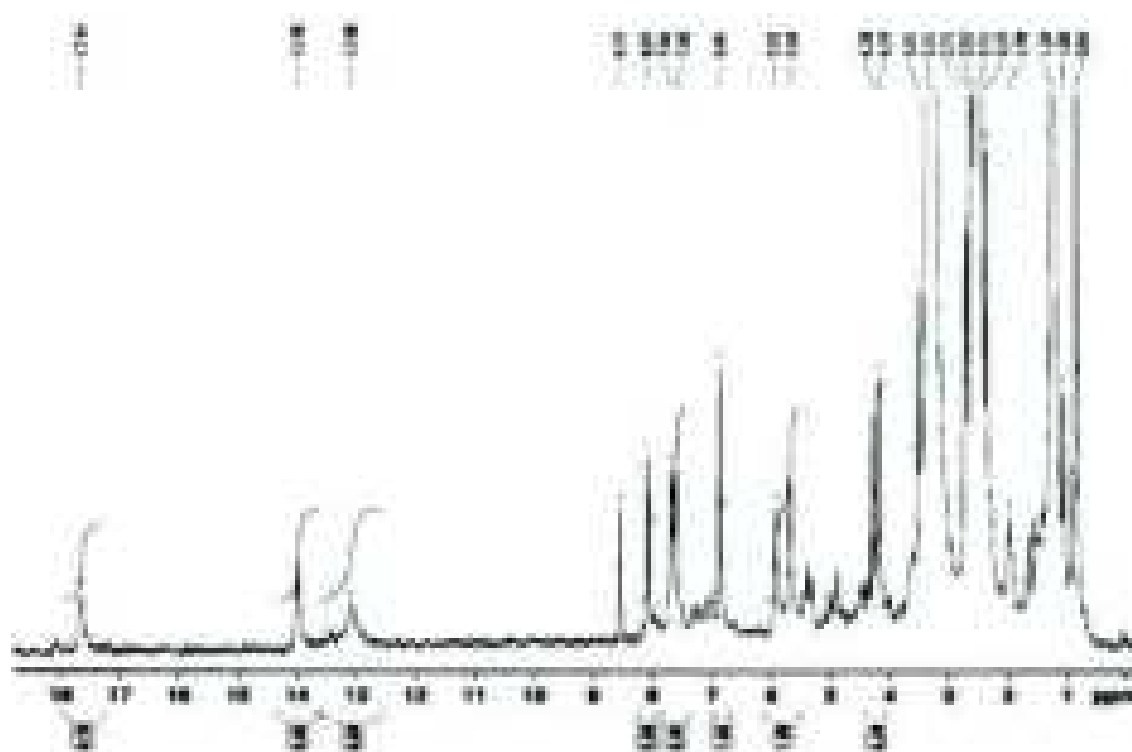
**Figure 31a.** Spectre de RMN protonique du produit R1.4 dissout dans le DMSO.



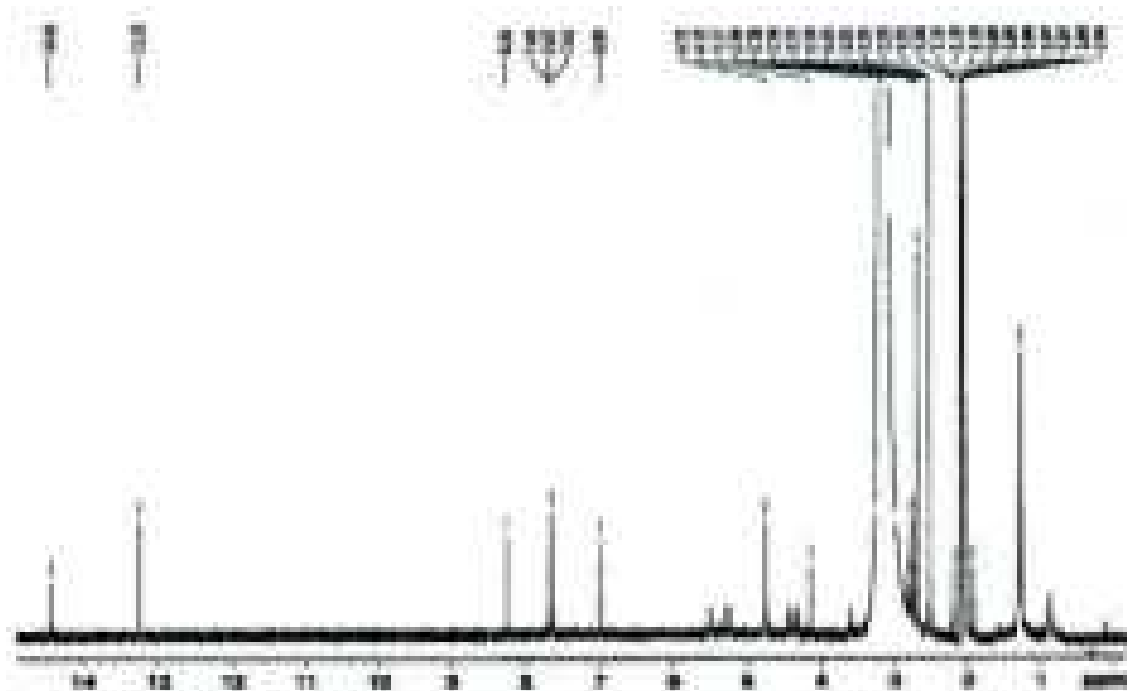
**Figure 31b.** Spectre de RMN protonique du produit R2.1 dissout dans le DMSO.



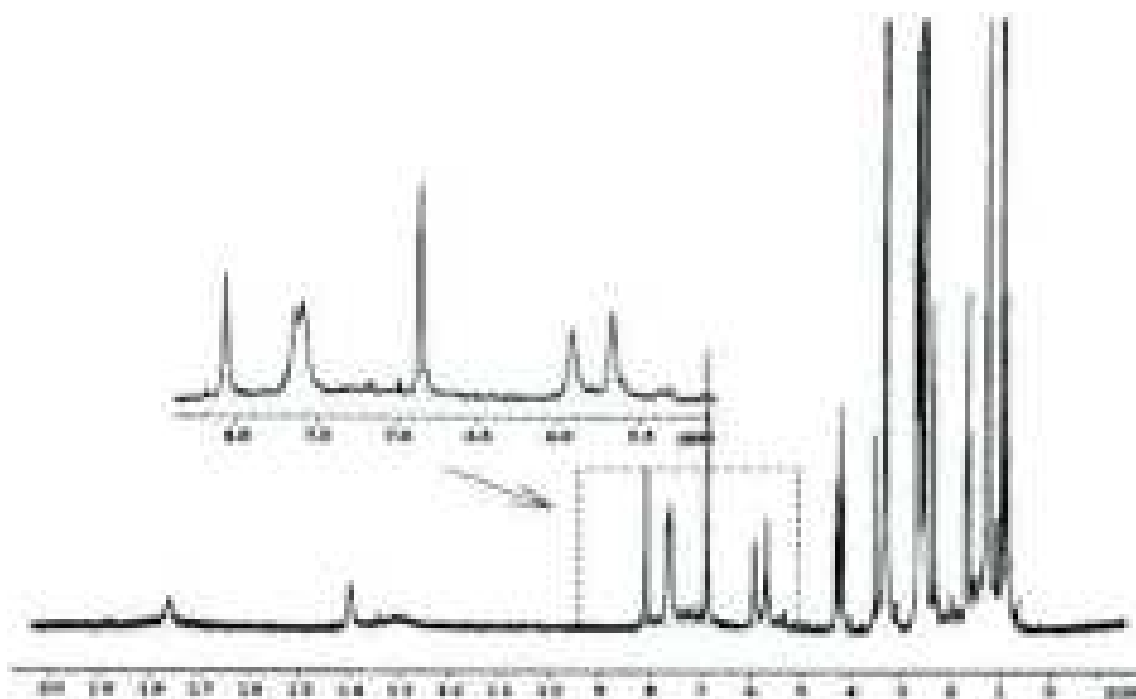
**Figure 31c.** Spectre de RMN protonique du produit R2.2 dissout dans le CD3OD.



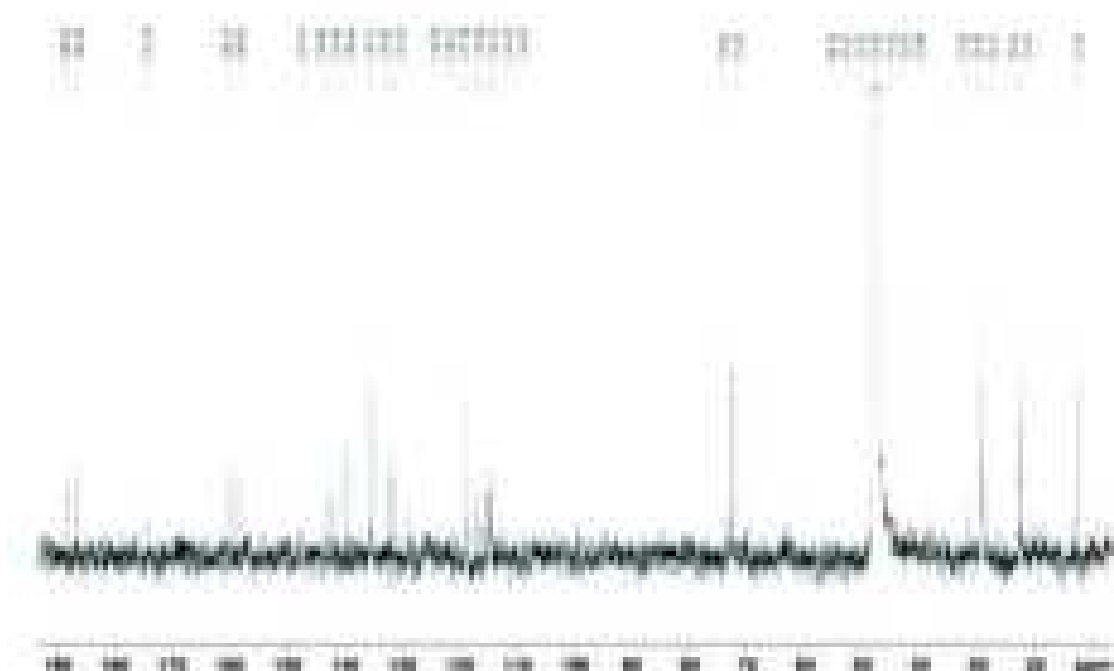
**Figure 31d.** Spectre de RMN protonique du produit R2.2 dissout dans le DMSO.



**Figure 31e.** Spectre de RMN protonique du produit R3.1 dissout dans le DMSO.



**Figure 31f.** Spectre de RMN protonique du produit R3.2 dissout dans le DMSO.



**Figure 32.** Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du composé R2.2 dissout dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

#### 1.4.3. RMN à double dimension

Cette analyse a été effectuée pour la molécule R2.2 et a permis d'élucider sa structure.

### 1.4.3.1. Corrélations $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY

Les résultats des corrélations  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC sont représentés par les figures 33, 34 et 35.

La RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY montre des couplages entre les protons de la partie aliphatique. L'étalement des protons au sein de cette partie aliphatique est illustrée dans la figure 34.

La tache T1 ( $\square = 1,32; 2,83$  ppm) indique qu'il y a un couplage entre le groupement  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$ .

Les taches T2 ( $\square = 4,36; 5,69$  ppm) et T3 ( $\square = 4,45; 5,92$  ppm) indiquent qu'il y a un couplage entre deux protons.

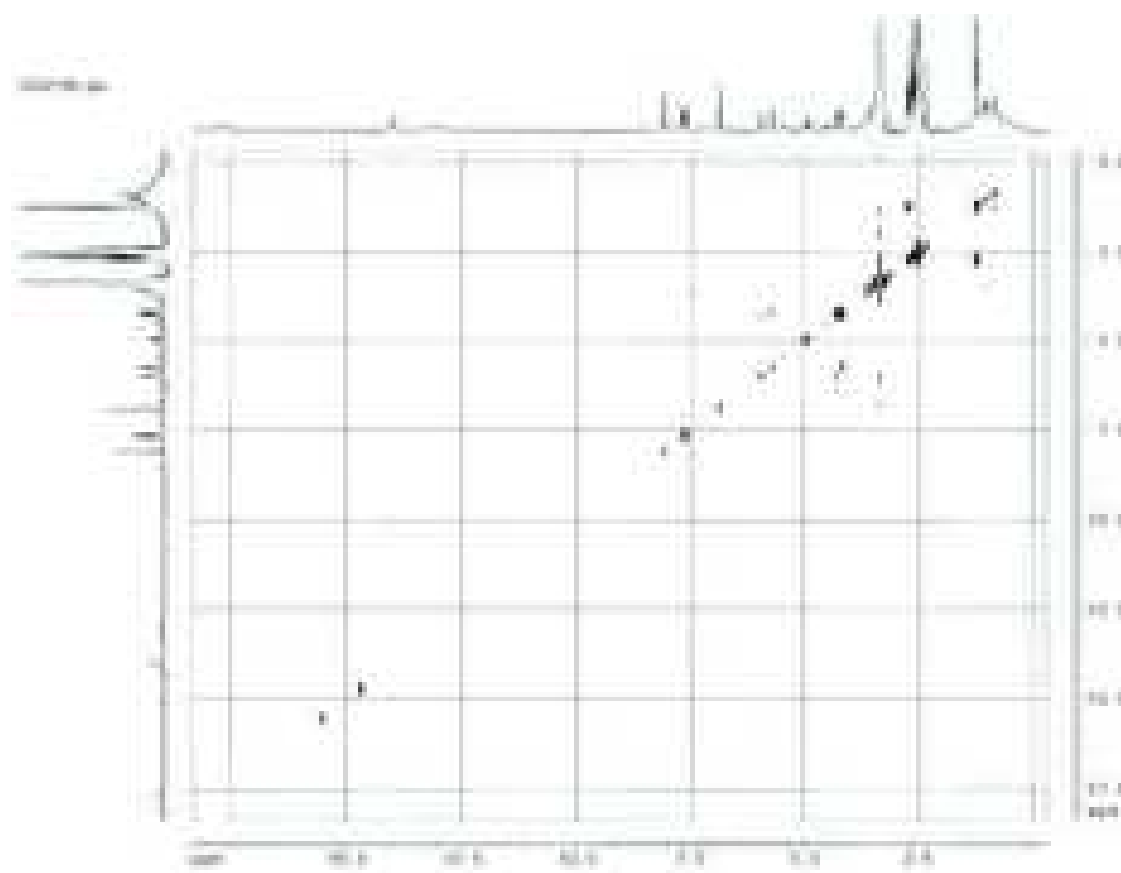


Figure 33. RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du composé R2.2.



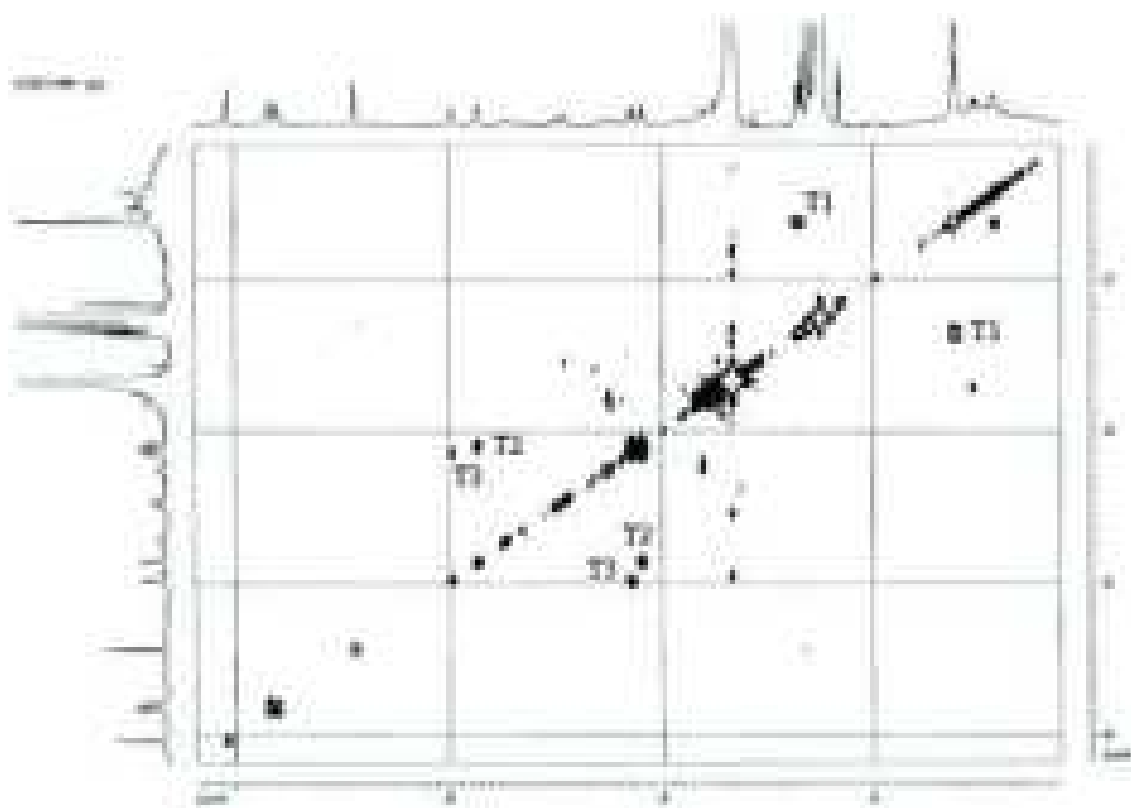


Figure 34. Etallement de la partie aliphatique de la RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du composé R2.2.

#### 1.4.3.2. Corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC

Les résultats de l'analyse  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC sont représentés par la figure 35 et révèlent pour l'antibiotique R2.2 une structure aromatique de type "quinone" composée de 5 cycles. Un des cycles est collé à l'un des 4 autres de manière angulaire.

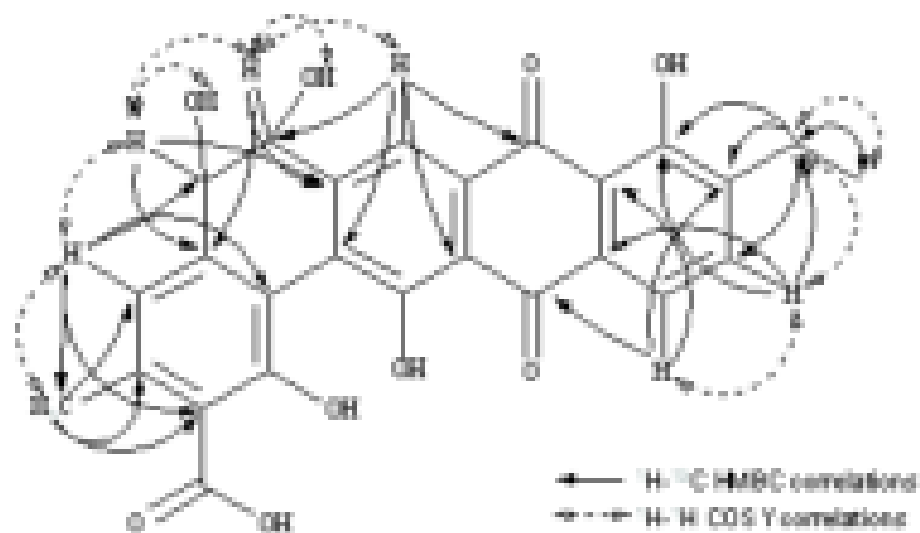
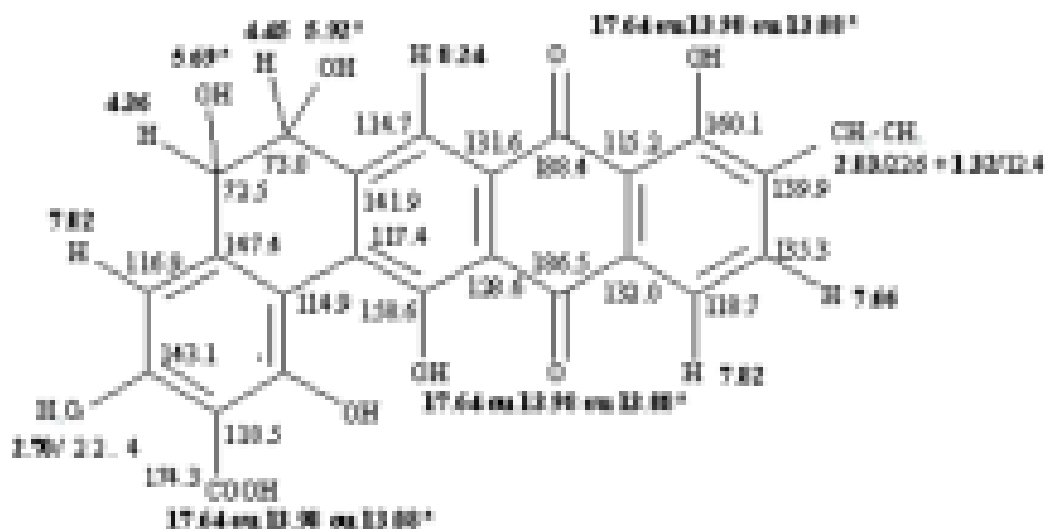


Figure 35. Corrélations  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC et  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY du composé R2.2.

La figure 36 représente la structure de la molécule R2.2 avec les déplacements chimiques. Cette structure comprend 26 atomes de carbones, 20 hydrogènes et 9 oxygènes, ce qui correspond à la formule  $C_{26}H_{20}O_9$ . La molécule R2.2 est composée de 5 cycles aromatiques avec un groupement acide ( $COOH$ ), un éthyle ( $CH_2-CH_3$ ), 1  $CH_3$ , 6  $CH$ , 5 groupements hydroxyles et 2 carbonyles de type quinone.



**Figure 36.** Structure et déplacements chimiques de la molécule R2.2.

déplacements chimiques dans le DMSO, tous les autres dans le  $CD_3OD$  (méthanol deutérié).

Les valeurs (**□**) de la RMN  $^1H$  en caractère gras, celles de la RMN  $^{13}C$  en caractère normal.

## 2. Discussion

Les antibiotiques sont fortement solubles dans le *n*-butanol et le méthanol, légèrement solubles dans l'acétate d'éthyle et insolubles dans l'eau, le dichlorométhane et le chloroforme.

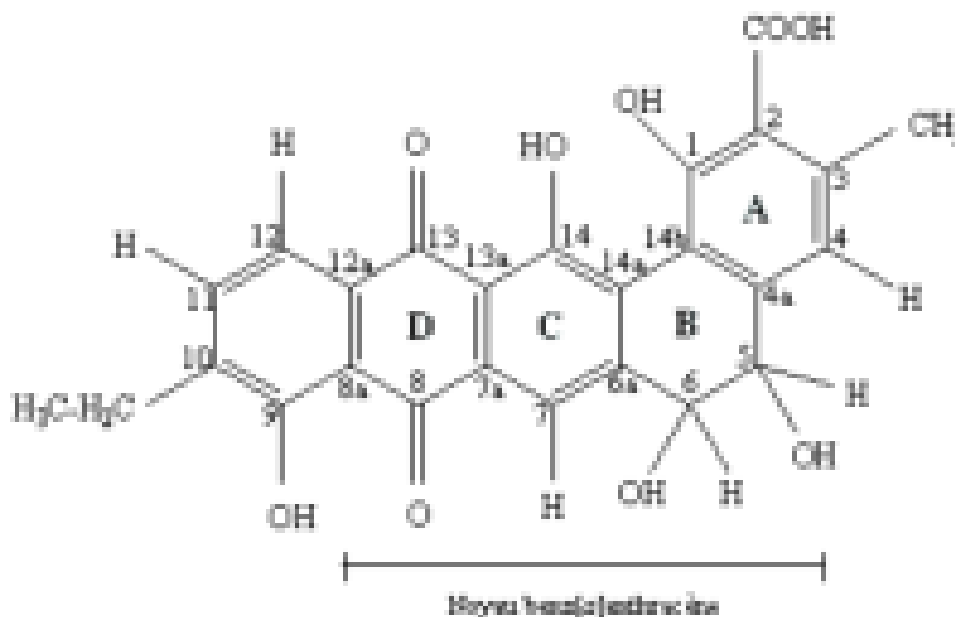
Les caractéristiques chimiques et spectroscopiques (UV-visible, infrarouge, masse et RMN du proton) des 8 antibiotiques rouges montrent une forte ressemblance dans leurs structures chimiques et suggèrent qu'ils appartiennent à la même famille chimique.

Les 4 molécules du R1 ont la même masse, celles du R2 et du R3 également. Ceci signifierait que R1.1~R1.4 sont des isomères ; il en est de même pour R2.1 et R2.2 et aussi R3.1 et R3.2. En se basant sur les caractéristiques chimiques et spectroscopiques communes de nos antibiotiques ainsi que les différences de leurs masses (qui ne sont que de 14, soit un méthyle en plus ou en moins), nous pouvons proposer les formules chimiques  $C_{25}H_{18}O_9$  et  $C_{27}H_{22}O_9$  pour les antibiotiques R1 et R3 respectivement.

Les RMN du proton et du carbone 13 ainsi que les RMN à double dimension ( $^1H-^1H$  et  $^1H-^{13}C$ ) ont permis de déterminer la structure de R2.2 (figure 37). C'est une structure aromatique composée de 5 cycles condensés de manière asymétrique ce qui nous oriente vers le groupe des angucyclines. Ces antibiotiques possèdent comme caractéristique structurale commune, un noyau tétracyclique (A, B, C et D) de type

benz[*a*]anthracène, caractérisé par quatre cycles dont le quatrième (cycle A) est orienté de manière angulaire (Metsä-Ketelä *et al.*, 2003). La molécule R2.2 possède en plus, un 5<sup>ème</sup> cycle collé au cycle D.

Les molécules R1 (R1.1 à R1.4) ont la même structure que R2.2 mais avec un CH<sub>3</sub> en moins (en positions 3 ou 10). Les molécules R3 (R3.1 et R3.2) possèdent au contraire un CH<sub>3</sub> en plus. La molécule R2.1 est en principe un isomère de position de R2.2.



**Figure 37.** Structure de l'antibiotique R2.2.

Les antibiotiques de la famille des angucyclines représentent le troisième groupe de déca kétides tétracycliques après les tétracyclines et les anthracyclines (Lebrasseur *et al.*, 2004). Les angucyclines sont subdivisées en deux sous-groupes, celui des angucyclines proprement dits possédant un ou plusieurs sucres liés au noyau aglycone par une liaison O-glycosidique et celui des angucyclinones n'ayant pas de sucre ou bien, possédant une partie sucre mais liée au noyau principal par une liaison C-glycosidique (Rohr et Thiericke, 1992). La structure de nos antibiotiques rouges ne révèle aucun sucre; ce sont donc des angucyclinones.

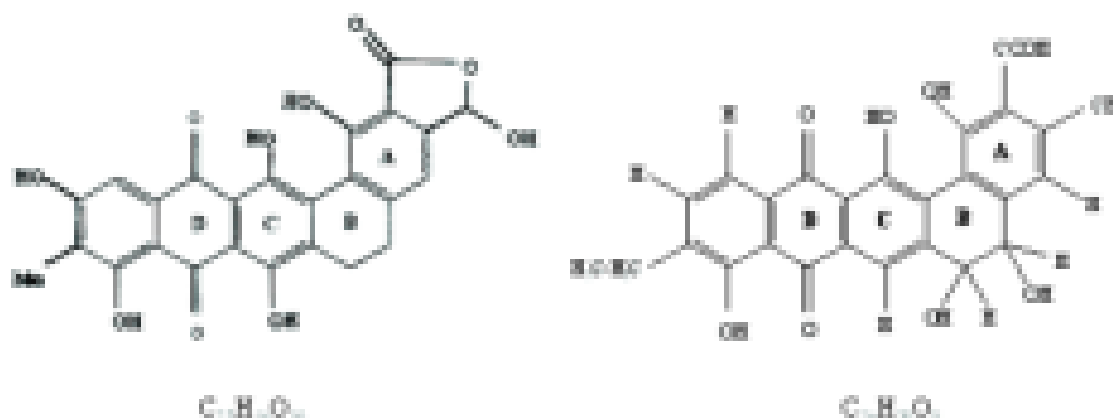
Les angucyclin(on)es sont presque exclusivement produites par les actinomycètes. Les genres producteurs sont représentés par *Streptomyces* (la majorité des molécules), *Actinomadura* (pradimicines), *Nocardia* (sakomycines) et *Streptosporangium* (Rohr et Thiericke, 1992). Parmi les espèces de *Streptosporangium*, *S. roseum*<sup>o</sup> 79089 produit 3 antibiotiques (WS79089A, B et C) de type angucycline (Tsurumi *et al.*, 1994). Ces 3 molécules sont des inhibiteurs de l'enzyme endothéline convertase. Cette enzyme est responsable, *in vivo*, de la conversion de la "big" endothéline-1 (précurseur) en endothéline-1. Ces derniers sont de puissants vasoconstricteurs sécrétés par les cellules endothéliales vasculaires, d'où l'intérêt pharmacologique et médical de rechercher des inhibiteurs de l'endothéline convertase. Outre le fait qu'elles soient de couleur rouge, les 3 molécules sont différentes de nos antibiotiques par leurs structures (figure 38) et leurs masses (488, 506 et 530 respectivement).



**Figure 38.** Structures chimiques des antibiotiques WS79089A, B et C produits par *Streptosporangium roseum* (Tsurumi et al., 1994).

En considérant leurs poids moléculaires et la structure du R2.2, nos antibiotiques sont comparés avec les angucyclines et les antibiotiques aromatiques décrits dans la littérature (Bycroft, 1988; "Dictionary of Natural Products", 2004; "Heterocycles", 2004; "American Chemical Society" = ACS, 2006). Les résultats de ces études comparatives indiquent que l'antibiotique R2.2 et nos autres antibiotiques sont de nouvelles molécules. Ils sont différents de toutes les angucyclines connues. Aucune angucycline n'a une masse de 462 (comme les R1) ou 490 (comme les R3). Une seule angucycline (enregistrée sous le numéro 300578-79-4 dans la base de données ACS, 2006) a une masse de 476 (comme les R2) mais sa structure est différente de celle du R2.2 (figure 39) principalement par la présence d'un cycle furane collé au cycle A en positions C-2 et C-3 et d'un groupement méthyle (au lieu d'un éthyle) en position C-10. Une différence dans le nombre et les positions des groupements hydroxyles est également notée.

Les angucyclin(on)es présentent un spectre d'activité très varié et intéressant, s'étendant des activités antimicrobiennes (antibactériennes, antifongiques et antivirales) jusqu'à l'inhibition de l'agrégation des plaquettes sanguines et l'inhibition d'enzymes. Mais c'est surtout leur activité antitumorale qui a suscité le plus d'intérêt (Krohn et Rohr, 1997). Larsen et O'Shea (1995) rapportent que les angucyclinones sans sucres augmentent, *in vitro* et *in vivo*, l'activité cytotoxique de la vincristine, un agent chimiothérapeutique utilisé dans le traitement de la leucémie.



**Figure 39.** Structures de l'angucyclinone 300578-79-4 (à gauche; ACS, 2006) et de l'antibiotique

Même si le mode d'action des angucyclin(on)es n'est pas encore clair, il existe une relation entre la structure et l'activité cytotoxique. Il est supposé que la partie la plus importante de la molécule est la partie aglycone, en raison des activités antitumorales dues au chromophore. Ceci est conforté par le fait que des angucyclinones (sans sucre) naturelles possèdent des activités antitumorales. De plus, des modifications dans la partie sucre des saquayamycines (angucyclines avec des résidus glycosidiques) n'entraînent aucun changement dans leur activité cytotoxique, alors qu'une modification dans la structure du noyau aglycone entraîne toujours la perte de l'activité biologique (Patil, 2001).

La majorité des angucyclines possèdent un groupement méthyle en position C-3 comme nos antibiotiques. Certaines, comme les brasiliquinones ont un groupement éthyle en C-3, leur conférant une puissante activité antitumorale et des activités antimicrobiennes et antivirales importantes (Patil, 2001). Les antibiotiques R3.1 et R3.2 ont une masse de 490, soit une différence de 14 avec l'antibiotique R2.2, correspondant probablement à un CH<sub>2</sub>. Si le CH<sub>2</sub> est collé en C-3, le groupement méthyle devient éthyle. De plus, les résultats de l'antibiographie des antibiotiques semi-purs montre que l'activité des R3 est plus importante que celles des R2 et R1. Cette hypothèse ne pourrait être confirmée ou infirmée que par la RMN du carbone 13 de ces molécules qui permettra à l'avenir d'élucider de manière sûre la structure chimique des R1 et R3.

## CHAPITRE II. ÉTUDE TAXONOMIQUE ET DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT D'ACTINOMYCÈTE SG163

### I. SOLEMENT ET TAXONOMIE DE L'ISOLAT SG163

#### 1. Isolement

L'isolat Sg163 a été isolé par la méthode des suspensions-dilutions à partir d'un échantillon de sol d'Adrar (AD2), prétraité à 120°C pendant 1 h (Nonomura et Ohara, 1969a) et sur milieu « chitine-vitamines B-agar » (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionné de cycloheximide (50 µg/mL).

#### 2. Détermination du genre

##### 2.1. Caractéristiques culturelles et micromorphologiques

Les colonies de l'isolat Sg163 cultivé sur divers milieux à 30°C pendant 14 jours sont circulaires et lisses avec un diamètre de 5-10 mm. Sa croissance est bonne sur les milieux ISP2 et OYG et modérée sur ISP3 et ISP4. Le mycélium est stable et non fragmenté. Le mycélium aérien (MA) est blanc-rosâtre. Celui du substrat est brun jaunâtre et produit un pigment soluble jaune sur tous les milieux utilisés. Le MA produit des sporanges globuleux de 4-8 µm de diamètre, chacun contenant une seule chaîne spiralée de spores non mobiles (figure 40). Les sporangiospores sont sphériques ou ovales, de 1-2 µm de diamètre.



**Figure 40.** Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de l'isolat Sg163 cultivé pendant 14 jours à 30°C sur milieu ISP2.

## 2.2. Étude chimiotaxonomique

L'étude chimiotaxonomique de l'isolat Sg163 montre la présence de l'isomère DL de l'acide diaminopimélique (*meso* DAP) dans sa paroi cellulaire, mais pas de glycine. L'analyse des hydrolysats cellulaires a permis de détecter le madurose comme sucre caractéristique, ainsi que le glucose, le galactose, le ribose et des traces de mannose. Ceci correspond au chimiotype III B tel que défini par Lechevalier et Lechevalier (1970b). Les phospholipides sont de type PIV caractérisé par la présence de la phosphatidyléthanolamine et des phospholipides contenant de la glucosamine (Lechevalier *et al.*, 1977).

## 2.3. Identification du genre

Sur la base des caractères morphologiques (présence de mycélium aérien, présence de sporanges sphériques à spores rondes non mobiles) et chimiques (paroi de type III B, phospholipides de type PIV), l'isolat Sg163 est rattaché au genre *Streptosporangium* (Nonomura, 1989).

## 3. Détermination de l'espèce

### 3.1. Étude physiologique

Le tableau 16 illustre les résultats des tests physiologiques de l'isolat Sg163. Trente (30) tests sont positifs et 33 sont négatifs. L'isolat Sg163 utilise l'arabinose, la caséine, la dextrine, le galactose, le glucose, le mannose, l'amidon, le tréhalose, la tyrosine et le xylose. Il est résistant au chloramphénicol, à la gentamicine, à la pénicilline, à la streptomycine et au tellurite de potassium. L'isolat ne dégrade pas le mélibiose, le raffinose, le sorbitol, la testostérone, la xanthine, l'hypoxanthine, l'azide, le butyrate, le citrate et le chlorure de sodium. Les pigments mélanoïdes ne sont pas produits et aucune croissance n'est observée à 42°C et en présence de phénol.

La comparaison des caractéristiques culturales et physiologiques de la souche Sg163 avec celles des espèces de référence de *Streptosporangium* indique que *S. roseum* et *S. vulgare* sont les plus proches (voir tableau 16 pour la physiologie comparée). Les trois souches ont la même couleur des mycéliums aérien et du substrat, la taille des sporanges, la forme des spores et quelques caractères physiologiques. Cependant, des différences significatives (18 différences) sont enregistrées entre les deux souches. Ces différences concernent la dégradation de l'arbutine, l'esculine, l'adonitol, le fructose, le glycérol, l'inositol, le lactose, le maltose, le mannitol et le saccharose, la décarboxylation de l'acétate, du propionate et du pyruvate de sodium, la réduction des nitrates, la résistance à l'oxytétracycline, la rifampicine et la vancomycine et la croissance en présence du crystal violet.

**Tableau 16. Caractéristiques physiologiques et biochimiques de *Streptosporangium* sp. Sg163 (1) en comparaison avec *S. roseum* (2) et *S. vulgare* (3).**

## Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens

Tests	Réaction			Tests	Réaction		
	1	2*	3*		1	2*	3*
Dégradation de :				Réduction des nitrates	+	+	-
Adénine	-	ND	ND	Décarboxylation des sels de sodium			
Arbutine	-	+	+	Acétate	+	-	-
Caséine	+	+	+	Benzoate	-	ND	ND
Esculine	-	+	+	Butyrate	-	-	-
Gélatine	+	+	d	Citrate	-	-	-
Amidon	+	+	+	Oxalate	-	ND	ND
Testostérone	-	-	-	Propionate	-	+	-
Tween 20	ND	+	+	Pyruvate	+	-	-
Tyrosine	+	+	+	Succinate	-	ND	ND
Xanthine	-	-	-	Tartrate	-	ND	ND
Hypoxanthine	-	-	-				
Adonitol	-	+	+	Résistance aux antibiotiques (mg/L)			
Arabinose	+	+	+	Chloramphénicol (25)	+	+	+
Cellobiose	+	ND	ND	Cyclosérine (10)	+	ND	ND
Dextrine	+	+	+	Erythromycine (10)	+	ND	ND
Dulcitol	-	ND	ND	Gentamicine (5)	+	+	+
Erythritol	-	ND	ND	Kanamycine (25)	-	ND	ND
Fructose	+	-	-	Novobiocine (10)	-	ND	ND
Galactose	+	+	+	Oxytétracycline (25)	+	-	-
Glucose	+	+	+	Pénicilline (25)	+	+	+
Glycérol	-	+	+	Rifampicine (5)	+	-	-
Inositol	-	+	d	Streptomycine (10)	+	+	+
Lactose	+	-	-	Vancomycine (5)	+	+	-
Maltose	+	+	-				
Mannitol	+	-	-	Croissance en présence de :			
Mannose	+	+	+	Crystal violet (0,05%)	-	+	+
Mélibiose	-	-	-	Lysozyme (0,005%)	-	ND	ND
□-méthyl-D-Glucoside	-	ND	ND	Phénol (1,5%)	-	-	-
Raffinose	-	-	-	Tellurite de potassium			
Rhamnose	+	+	d	(0,005% and 0,01%)	+	+	+
Ribose	-			Azide de sodium (0,001%)	-	-	-
Saccharose	-	+	+	Chlorure de sodium (2%)	-	-	-
Sorbitol	-	-	-				
Tréhalose	+	+	+	Croissance à :			
Xylose	+	+	+	42°C	-	-	-
				pH 5	-	ND	ND
Production de pigment mélanoïde	-	-	-	pH 9	+	ND	ND

**Note.** +, test positif ; -, test négatif ; d, 11-89% des souches sont positives; ND, test non déterminé.

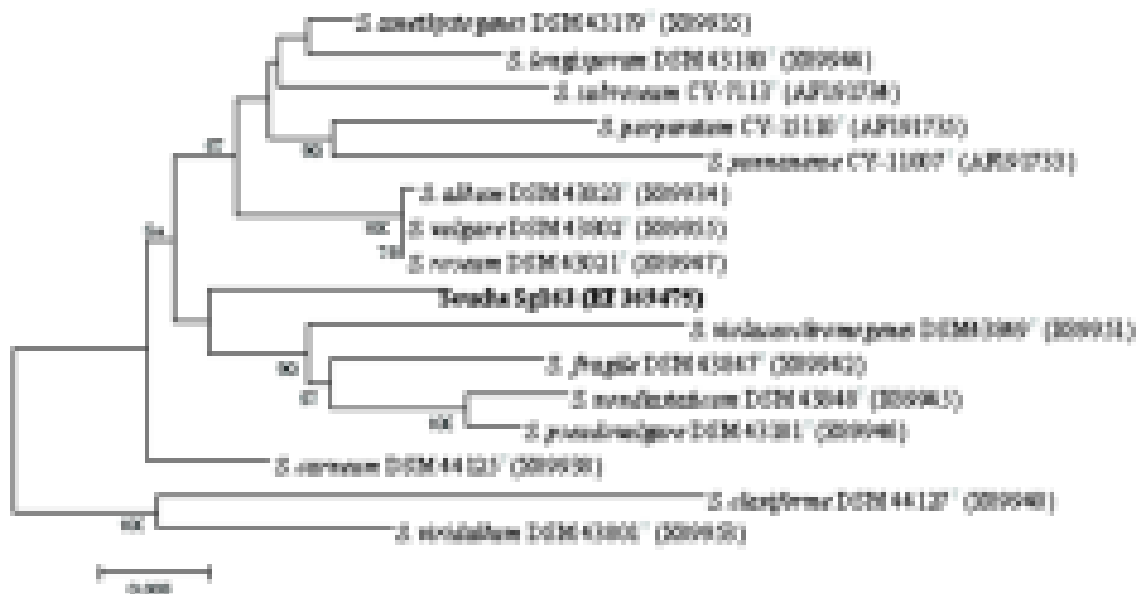
\*Whitham *et al.* (1993) et Holt *et al.* (1994).

### 3.2. Étude moléculaire: séquençage de l'ADNr 16S et phylogénie



Le séquençage de la fraction 16S de l'ADN ribosomique a permis de déterminer une séquence de 1446 nucléotides. Cette séquence a été comparée avec les espèces de référence de bactéries contenues dans les bases de données génomiques. Les résultats du "BLAST" confirment l'appartenance de l'isolat Sg163 au genre *Streptosporangium* et montrent un taux de similitude allant de 96,3 % à 97,8 % entre les espèces types du genre.

*Streptosporangium roseum* DSM 43021<sup>T</sup> et *S. vulgare* DSM 43802<sup>T</sup> sont les espèces les moins différentes. L'analyse phylogénique par la méthode du "neighbor joining" montre la position de l'isolat Sg163 et sa relation avec les souches types de *Streptosporangium* (figure 41). Nous remarquons que cet isolat constitue une lignée phylétique distincte suggérant très fortement une nouvelle espèce.



**Figure 41.** Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat Sg163 et les souches-types des espèces du genre *Streptosporangium*.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les pourcentages du support « bootstrap » effectués par la méthode du « neighbor-joining ». Ne sont donnés que les pourcentages supérieurs à 50%. La barre indique 0,005 substitutions par position de nucléotide. Les numéros des séquences des souches sont donnés entre parenthèses.

La séquence de l'isolat Sg163 a été déposée dans la banque de gènes GenBank sous le numéro d'accèsion EF 369475.

#### 4. Conclusion

Les résultats des études morphologique, chimique et moléculaire ont permis d'identifier l'isolat Sg163 au genre *Streptosporangium*. Cet isolat n'a pu être rattaché à aucune des espèces connues de *Streptosporangium*. Les souches les moins différentes *S. roseum* et *S. vulgare*, restent cependant assez distinctes de la nôtre. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que l'isolat Sg163 représente une nouvelle espèce.

## II. PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES PAR L'ISOLAT SG163

## 1. Résultats

### 1.1. Mise en évidence de l'activité antibiotique

#### 1.1.1. En milieu solide

Les résultats de l'activité antibiotique par la méthode des stries croisées sont présentés dans le tableau 17. L'isolat Sg163 présente une forte activité contre tous les champignons testés et la levure *Candida albicans* pathogène pour l'homme. Presque tous les champignons filamenteux inhibés sont phytopathogènes et toxigènes. Une bonne activité est également notée contre les bactéries à Gram positif. Celles à Gram négatif ne sont pas inhibées.

#### 1.1.2. En milieux liquides

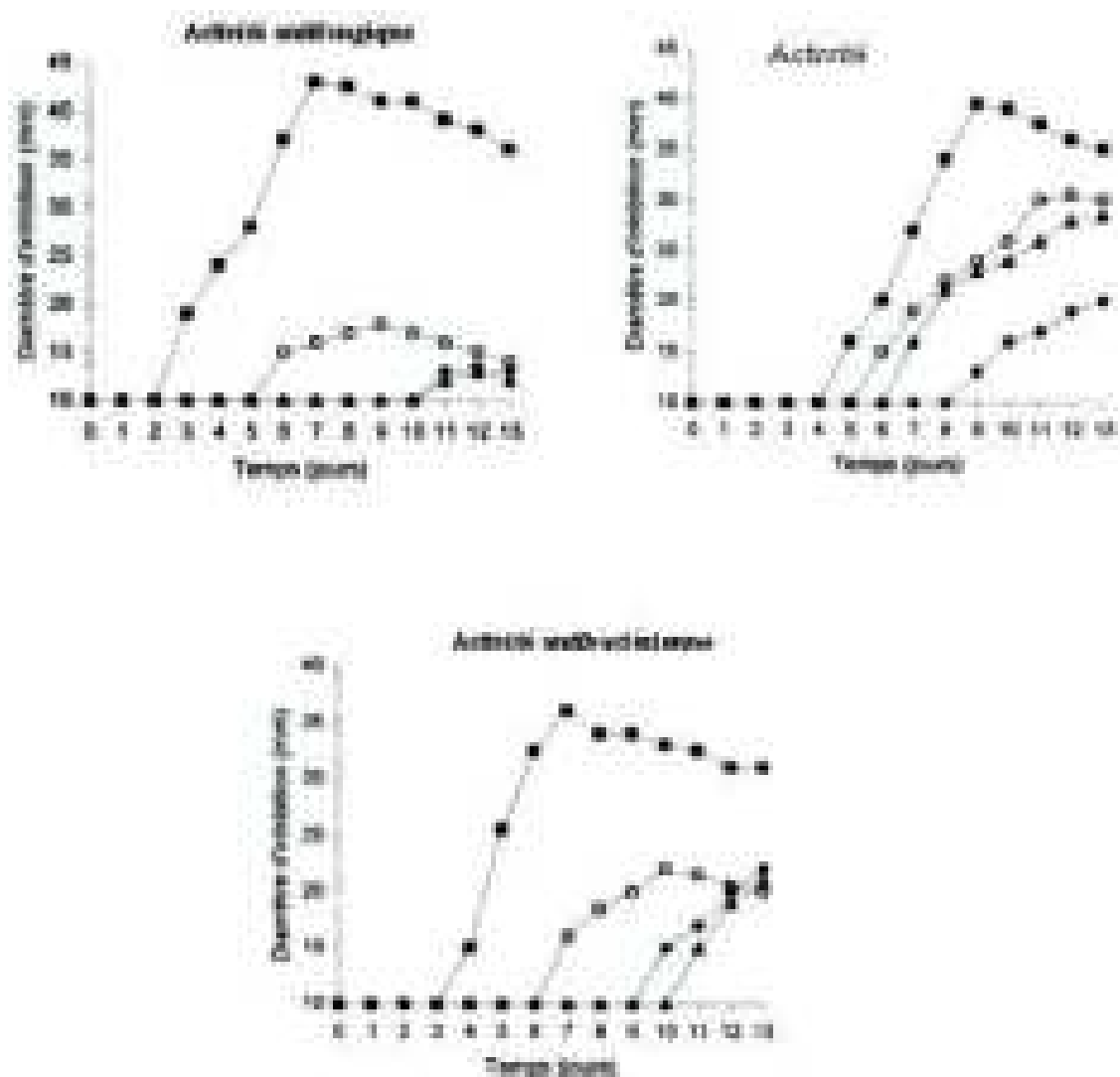
##### 1.1.2.1. Milieu synthétique

Dans les milieux liquides, le milieu synthétique (MS) additionné de glucose ou d'amidon, et avec ou sans extrait de levure et CaCO<sub>3</sub> est comparé au milieu ISP2 (milieu complexe). Les résultats (figure 42) montrent que l'activité la plus importante est obtenue dans le milieu ISP2 où les activités antifongique, antilevurienne et antibactérienne apparaissent et atteignent leurs maxima plus tôt que dans les autres milieux. Aucune activité n'est décelée dans les milieux MS + amidon, MS + amidon + extrait de levure, MS + amidon + CaCO<sub>3</sub>, MS + amidon + extrait de levure + CaCO<sub>3</sub>, MS + glucose. Les milieux ayant montré une activité antibiotique sont : le milieu ISP2, MS + glucose + extrait de levure + CaCO<sub>3</sub>, MS + glucose + extrait de levure, MS + glucose + CaCO<sub>3</sub>. Le glucose additionné au milieu synthétique est préféré à l'amidon. L'ajout d'extrait de levure et de CaCO<sub>3</sub> augmente le taux de production d'antibiotiques par rapport à l'ajout d'extrait de levure seul ou de CaCO<sub>3</sub> seul.

Tableau 17. Activité antibiotique de l'isolat Sg163.

Microorganismes-tests	Distance d'inhibition (mm)
Champignons filamenteux	
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	12
<i>Aspergillus ochraceus</i> A3174	10
<i>Botrytis cinerea</i> B354	16
<i>Fusarium culmorum</i> F3288	13
<i>Fusarium graminearum</i> F5883	15
<i>Fusarium sporotrichioides</i> F13440	11
<i>Fusarium verticilloides</i> F6442	15
<i>Geotrichum candidum</i> G669	12
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	25
<i>Penicillium citrinum</i> P1843	14
<i>Penicillium verrucosum</i> P1850	30
<i>Penicillium</i> sp.	5
<i>Pythium irregulare</i> PY120	10
<i>Sclerotium sclerotiorum</i> S358	8
Levures	
<i>Candida albicans</i> IPA 200	10
<i>Candida albicans</i> IPA 224	19
<i>Kluyveromyces lactis</i> K231	13
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> R254	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	34
Bactéries à Gram positif	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	10
bactéries à Gram négatif	0

Note. Les microorganismes suivants ne sont pas inhibés par l'isolat Sg163. Il s'agit d'*Agrobacterium tumefaciens* A2410, *Agrobacterium vitis* A964, *Erwinia amylovora* E1994, *Erwinia carotovora* sous espèce *carotovora* E1336, *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* X1119, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas fluorescens* PF11 et *Serratia marcescens* SM80.



**Figure 42.** Activités antifongique (contre *Mucor ramannianus*), antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*) et antibactérienne (contre *Micrococcus luteus*) de l'isolat Sg163 en milieux liquides (fioles d'Erlenmeyer de 500 mL; 250 rpm; 30°C).

**Note.** Les activités antimicrobiennes sont mesurées par la méthode des puits. Le diamètre d'inhibition comprend celui du puits qui est de 10 mm. (■), milieu ISP2; (○), MS + glucose + extrait de levure + CaCO<sub>3</sub> ; (□), MS + glucose + extrait de levure; (▲), MS + glucose + CaCO<sub>3</sub>.

### 1.1.2.2. Milieux complexes

Afin de choisir le milieu de production optimale, quatre autres milieux de culture préconisés par différents chercheurs sont testés en comparaison avec l'ISP2. Les résultats sont représentés par la figure 43. Les activités antifongique, antilevurienne et antibactérienne sont observées sur tous les milieux testés. Cependant, les activités sont nettement meilleures dans le milieu ISP2. Le milieu ISP4 a globalement fourni les plus faibles activités. Le milieu ISP2 a donc été choisi comme milieu de production pour la suite du travail.

## 1.2. Cinétique de production en milieu ISP2

Le milieu ISP2 a été sélectionné pour réaliser une cinétique de croissance et de production en fioles agitées et en fermenteur. Au cours de la fermentation, la croissance (poids sec de la biomasse), la production d'antibiotiques (méthode de diffusion en puits) et le pH sont mesurés quotidiennement pendant 13 jours. Leur évolution au cours du temps est représentée dans la figure 44.

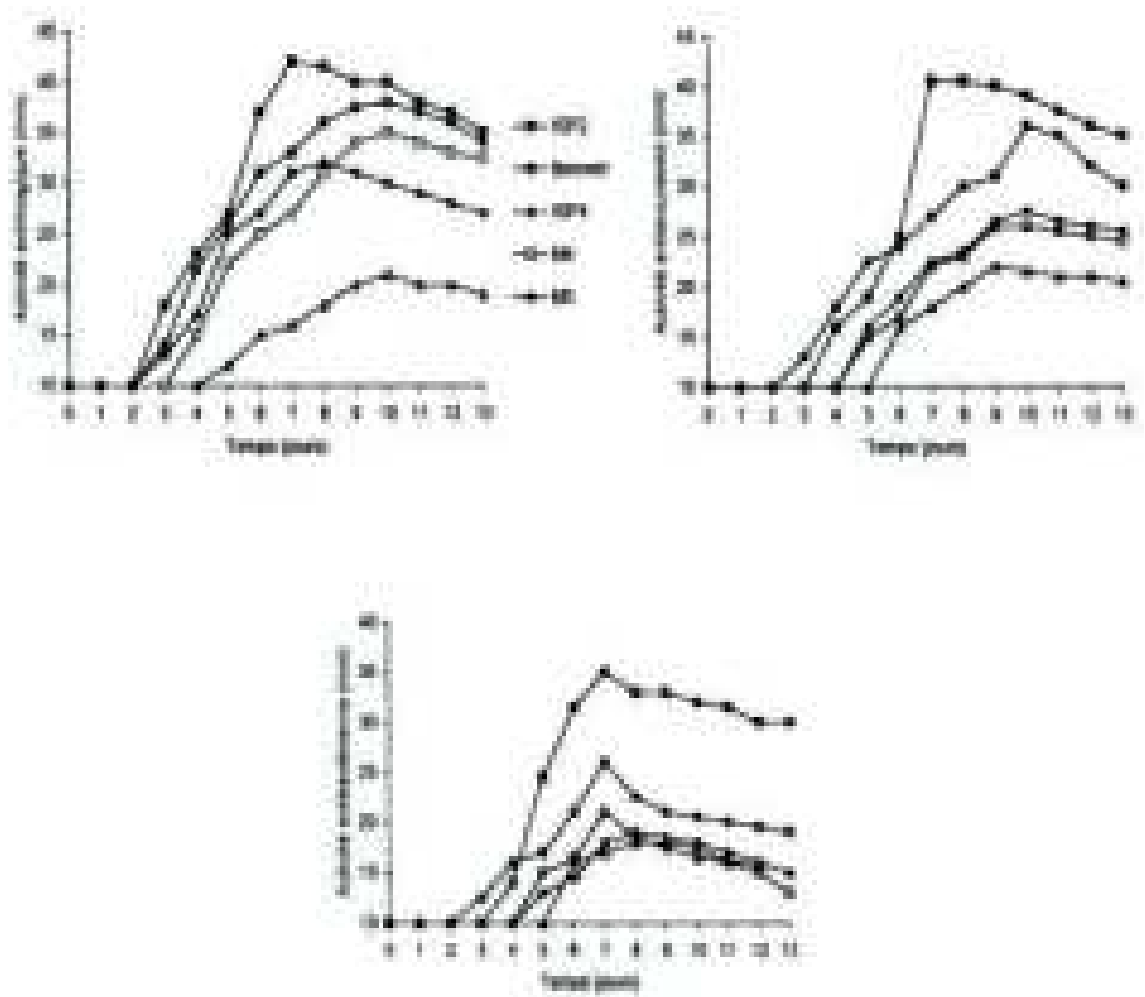
Le mycélium se présente sous forme de pelotes de couleur beige et de dimension variable (taille plus importante en fermenteur qu'en fioles d'Erlenmeyer). Le filtrat de culture est de couleur jaune pâle les 4 premiers jours de fermentation et vire progressivement au brun jaunâtre de plus en plus foncé.

### 1.2.1. Production en fioles d'Erlenmeyer

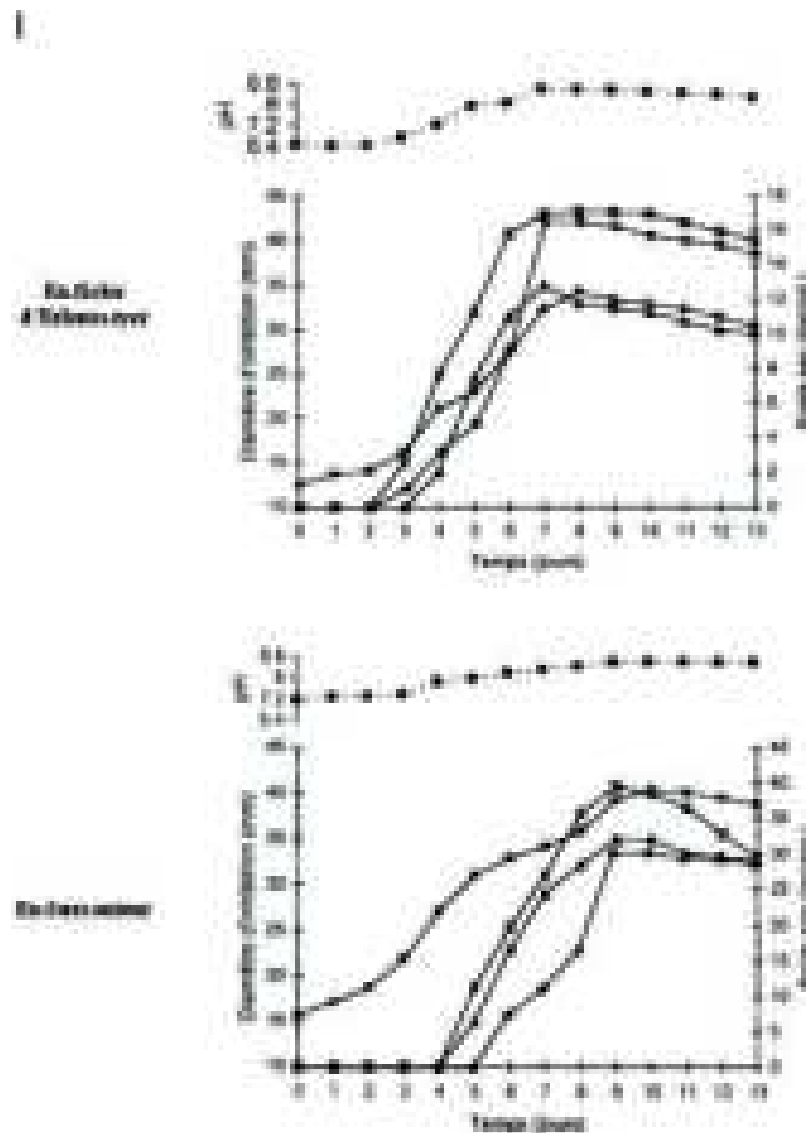
Dans la cinétique de production en fioles d'Erlenmeyer, les résultats montrent que les activités suivent la même allure avec le temps. Les activités antifongique et antilevurienne sont détectées le 3<sup>ème</sup> jour de fermentation. L'activité antibactérienne apparaît le 4<sup>ème</sup> jour. Elles atteignent leur maxima le 7<sup>ème</sup> jour. L'activité antifongique est plus forte que l'antibactérienne. Ces activités antibiotiques évoluent en corrélation avec la croissance. De légères variations du pH sont enregistrées avec un maximum (pH 8,6) atteint le 8<sup>ème</sup> jour de fermentation.

### 1.2.2. Production en fermenteur

Les activités antifongique et antibactérienne ne sont décelées que le 5<sup>ème</sup> jour de fermentation. L'activité antilevurienne apparaît le 6<sup>ème</sup> jour. Leur maxima sont atteints le 9<sup>ème</sup> jour. La production d'antibiotiques est légèrement meilleures en fioles qu'en fermenteur. De plus, les valeurs maximales d'activités en fioles agitées sont atteintes au 7<sup>ème</sup> jour d'incubation, soit deux jours plus tôt que dans le fermenteur.



**Figure 43.** Production d'antibiotiques antifongiques (contre *Mucor ramannianus*), antilevuriens (contre *Saccharomyces cerevisiae*) et antibactériens (contre *Micrococcus luteus*) par l'isolat Sg163 en milieux liquides ( fioles d'Erlenmeyer de 500 mL; 250 rpm; 30°C).



**Figure 44.** Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques en milieu ISP2, en fioles d'Erlenmeyer (500 mL; 250 rpm; 30°C) et en fermenteur (1,5 L; 250 rpm; 30°C).

**Note.** Les activités antimicrobiennes sont mesurées par la méthode des puits. Le diamètre d'inhibition comprend celui du puits qui est de 10 mm. (□), activité antifongique (contre *Mucor ramannianus*); (◻), activité antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*); (▲), activité antibactérienne (contre *Micrococcus luteus*); (○), poids sec; (●), pH.

## 2. Discussion

L'isolat Sg163 possède des activités antifongique, antilevurienne et antibactérienne intéressantes. L'activité antibactérienne est dirigée contre les bactéries à Gram positif mais pas contre celles à Gram négatif testées. Les milieux favorables à la production d'antibiotiques par l'isolat Sg163 sont les milieux complexes contenant du glucose comme source de carbone. Le milieu minéral additionné d'amidon comme source de carbone et même d'extrait de levure et de  $\text{CaCO}_3$  n'a pas permis de déceler ces activités. Ce milieu

avec du glucose, de l'extrait de levure et/ou du  $\text{CaCO}_3$  a permis de détecter des activités mais qui sont restées faibles par rapport au milieu ISP2.

Tous les milieux complexes testés ont permis une production des trois types d'activités antibiotiques mais à des degrés différents. Le milieu ISP2, à base de glucose, d'extrait de malt et d'extrait de levure s'est révélé meilleur. Il est suivi du milieu Bennett, puis des milieux de Omura *et al.* (1989) et de Gilpin *et al.* (1995) qui ont donné des résultats pratiquement similaires pour les trois activités. Les milieux ISP2, Bennett et celui de Omura *et al.* (1989) contiennent du glucose comme source de carbone (voir composition en annexe 3). Celui de Gilpin *et al.* (1995) contient du glycérol. Le milieu Bennett contient 10 g de glucose, tout comme l'ISP2. La production moindre d'antibiotiques dans le premier milieu cité, pourrait être expliquée par le manque d'extrait de malt qui jouerait un rôle déterminant dans la synthèse d'antibiotiques. Cet extrait est composé de près de 52% de maltose, 19% de glucose, 2% de saccharose, 15% de dextrans, 4% d'autres sucres, 5% de protéines et 3% d'eau (Fluka). Le milieu de Omura *et al.* contient 20 g de glucose. Cette source de carbone rapidement assimilable est connue comme étant un excellent stimulant de la croissance microbienne (Hermans *et al.*, 1989; Spížek et Tichý, 1995), et sa concentration est déterminante pour la production d'antibiotiques. En effet, pour de nombreux microorganismes, elle exerce à haute concentration, une action négative sur la synthèse d'antibiotiques (répression catabolique glucidique ou effet glucose). Plusieurs auteurs (Martin et Demain, 1980; Demain *et al.*, 1983; Larpent et Sanglier, 1989; Spížek et Tichý, 1995) ont constaté que les fortes concentrations de glucose ou d'autres sources carbonées facilement assimilables sont généralement défavorables à la production. Dans notre cas, il semble que les antibiotiques de la souche Sg163 ne soient pas soumis à cette répression catabolique (du moins, aux concentrations de glucides utilisées).

Cette étude a permis de sélectionner le milieu ISP2 comme milieu de production pour la suite du travail.

### III. EXTRACTION, DÉTECTION ET PURIFICATION DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT SG163

Avant de présenter les résultats de l'extraction, de la détection et de la purification des antibiotiques de l'isolat Sg163, nous présentons dans la figure 45, un schéma du protocole général suivi.

#### 1. Résultats

##### 1.1. Extraction des antibiotiques

L'extraction a été effectuée à partir du mycélium et du filtrat de culture.

##### 1.1.1. Extraction à partir du mycélium

L'extrait méthanolique du mycélium (60 mL de méthanol pour 50 g de biomasse humide et égouttée) provenant de 1 L de culture a montré de bonnes activités par antibiographie (disque de 6 mm de diamètre) contre les souches-cibles: 20 mm contre *Mucor ramannianus*, 32 mm contre *Saccharomyces cerevisiae* et 19 mm contre *Micrococcus luteus*.



### 1.1.2. Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction est effectuée avec 5 solvants organiques de polarités différentes (50 mL de filtrat de culture extraits par 50 mL de chaque solvant). Les activités sont mesurées par la méthode des disques de papier (80  $\mu$ L pour *Mucor ramannianus* et 60  $\mu$ L pour *Saccharomyces cerevisiae* et *Micrococcus luteus*). Les activités contre le champignon et la bactérie sont notées dans les phases organiques des extraits au *n*-butanol, à l'acétate d'éthyle, au dichlorométhane et au benzène, mais pas dans celui au *n*-hexane (figure 46). L'activité contre *M. luteus* et *M. ramannianus* est meilleure avec le *n*-butanol. Cependant, aucun extrait organique n'est actif contre la levure dont l'activité reste présente dans la phase aqueuse.

Pour la suite des études, nous avons donc retenu le *n*-butanol comme solvant d'extraction des activités antifongique et antibactérienne.

La phase aqueuse présente une activité antilevurienne: 36 mm contre *Saccharomyces cerevisiae*. Cette activité a été mesurée par la méthode de diffusion des puits (200  $\mu$ L de phase aqueuse dans un puits de 10 mm de diamètre).

### 1.2. Recherche des polyènes dans les extraits bruts organique et aqueux

Les spectres UV-visible des extraits bruts des phases organique (butanolique) et aqueuse n'ont pas montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes. Les activités antibiotiques ne sont donc pas polyéniques. Les maxima d'absorption (figure 47) sont notés à 208 et 250 nm pour l'extrait butanolique et à 214 et 248 nm pour la phase aqueuse. *Mucor Micrococcu*

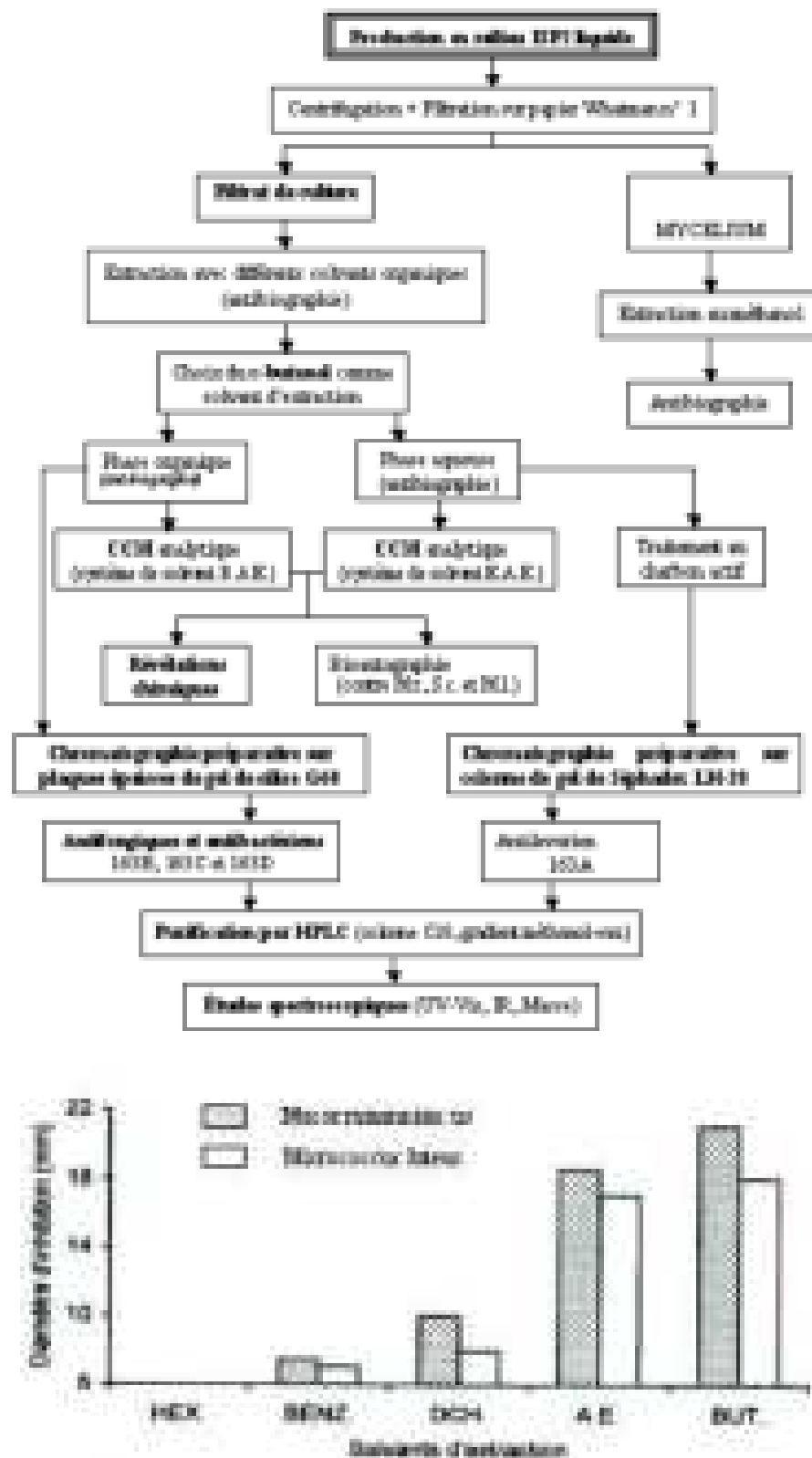
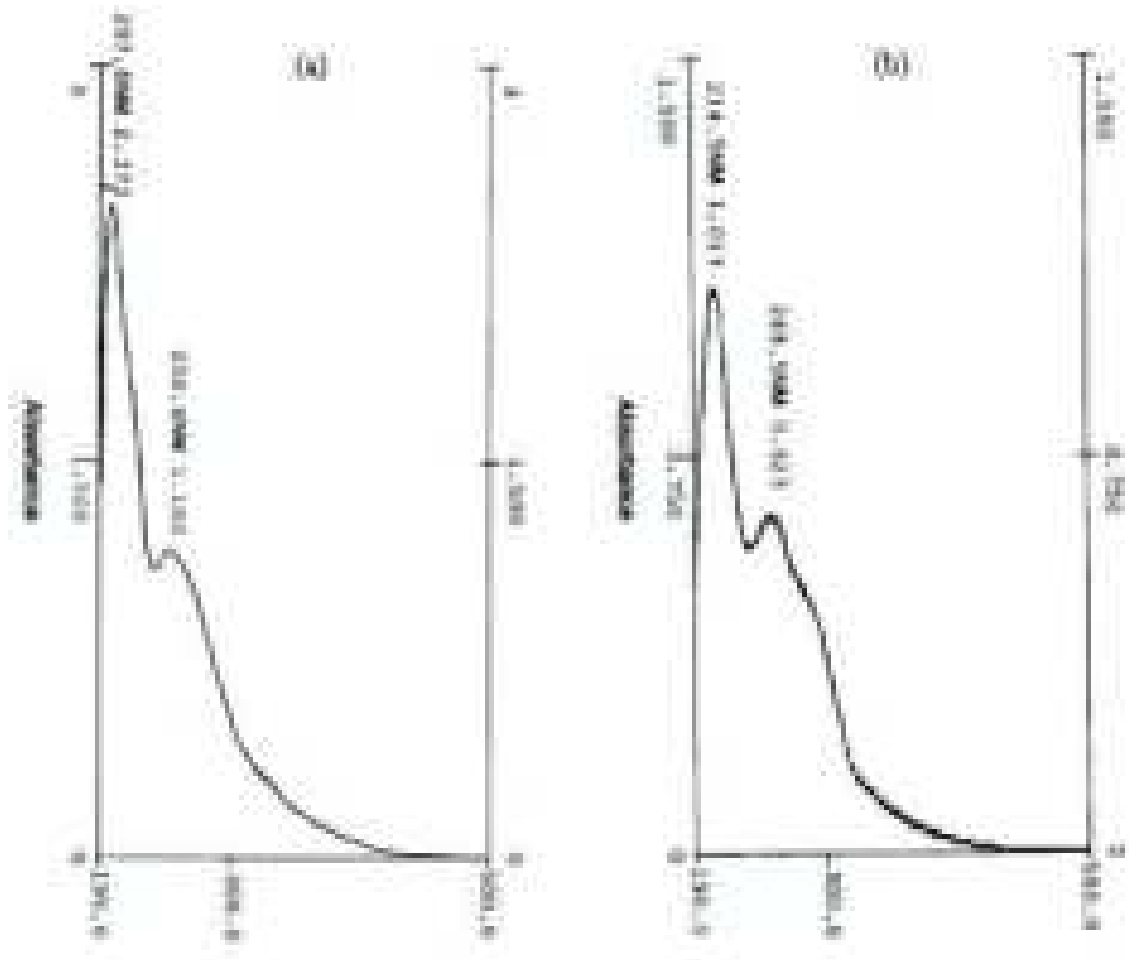


Figure 46. Activités des extraits du filtrat de culture de l'isolat Sg163 par différents solvants organiques.

**Note :** HEX., *n*-hexane ; BENZ., benzène ; DCH., dichlorométhane ; A.E., acétate d'éthyle ; BUT., *n*-butanol. Le diamètre du disque (6 mm) est inclus dans les valeurs des diamètres d'inhibition.



**Figure 47.** Spectres UV-visible des extraits bruts butanolique (a) et aqueux (b) de l'isolat Sg163.

### 1.3. Traitement de la phase aqueuse au charbon actif

Ce traitement est destiné à la phase aqueuse qui contient l'antibiotique antilevurien. Il permet d'éliminer les pigments bruns inactifs sécrétés dans le milieu de culture et gênants lors des purifications, en les adsorbant sur le charbon actif. Cependant, il s'est avéré que le charbon actif adsorbe également l'antibiotique de manière partielle. Le culot (de charbon) est traité avec une solution aqueuse d'acétone à 60% (sous agitation pendant 30 min) ou lavé à l'eau (en agitation pendant 30 min), afin de désorber cet antibiotique.

La recherche des activités est effectuée par la méthode des puits (diamètre du puits: 8mm, 100  $\mu$ l/puits) contre la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Le diamètre d'inhibition des différentes phases est comme suit :

- Phase aqueuse non traitée au charbon actif :	40 mm.
- Phase aqueuse traitée au charbon actif :	20 mm.
- Charbon actif lavé à l'eau :	23 mm.
- Charbon actif désorbé à l'acétone 60% :	35 mm.

L'activité après traitement au charbon actif est réduite de moitié. L'acétone à 60% permet de désorber l'antibiotique du charbon et donc le récupérer en le mélangeant à la phase aqueuse déjà traitée au charbon actif.

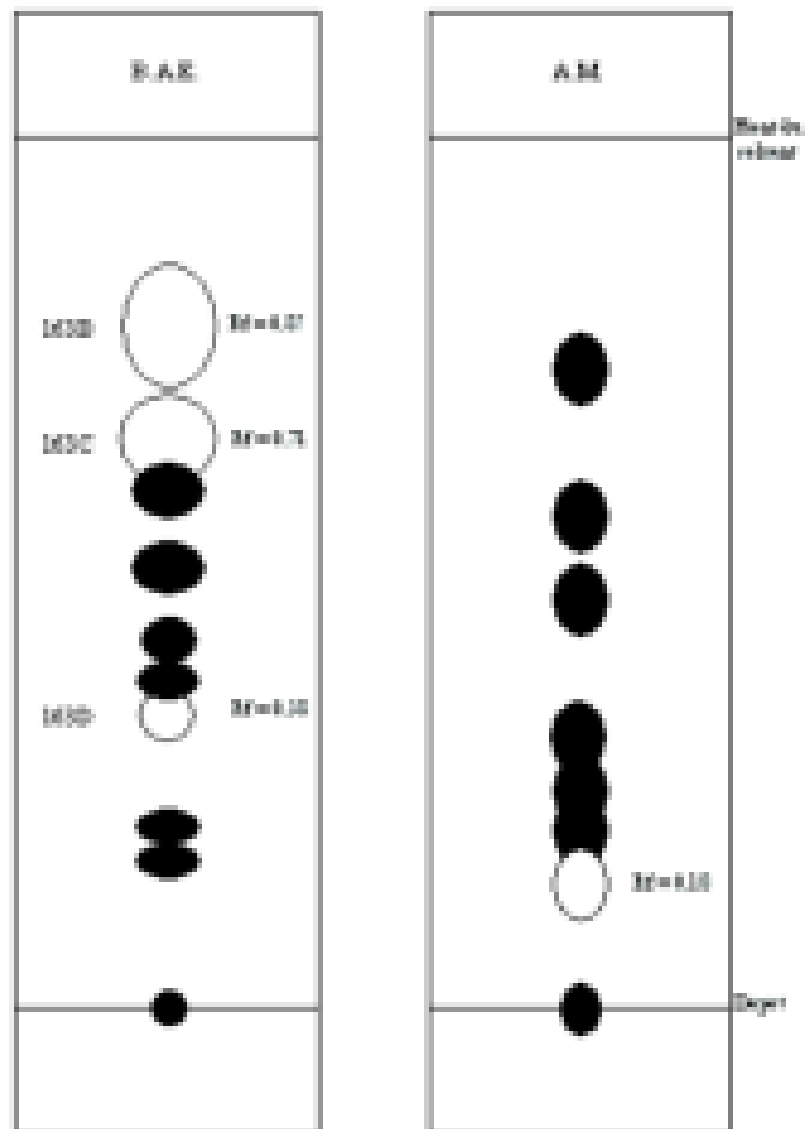
### 1.4. Détection des antibiotiques par bioautographie

#### 1.4.1. Phase organique

Après extraction au *n*-butanol, la phase organique est analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice G60. Les antibiotiques sont détectés par bioautographie contre *Mucor ramannianus* et *Micrococcus luteus*. Deux systèmes de solvants sont testés. Dans le solvant A.M., une seule tache active contre *M. luteus* et *M. ramannianus* est détectée à un Rf de 0,18. Par contre dans le B.A.E., trois antibiotiques à activités antibactérienne et antifongique sont détectés (figure 48). Ils sont désignés 163B (Rf = 0,85), 163C (Rf = 0,71) et 163D (Rf = 0,38). Les deux premiers sont fortement actifs et le troisième, faiblement actif. Ils sont par contre tous inactifs contre *S. cerevisiae*. Le système de solvant B.A.E. a été retenu pour la suite des expériences, sachant que A.M. ne permet pas de séparer les antibiotiques entre eux.

#### 1.4.2. Phase aqueuse

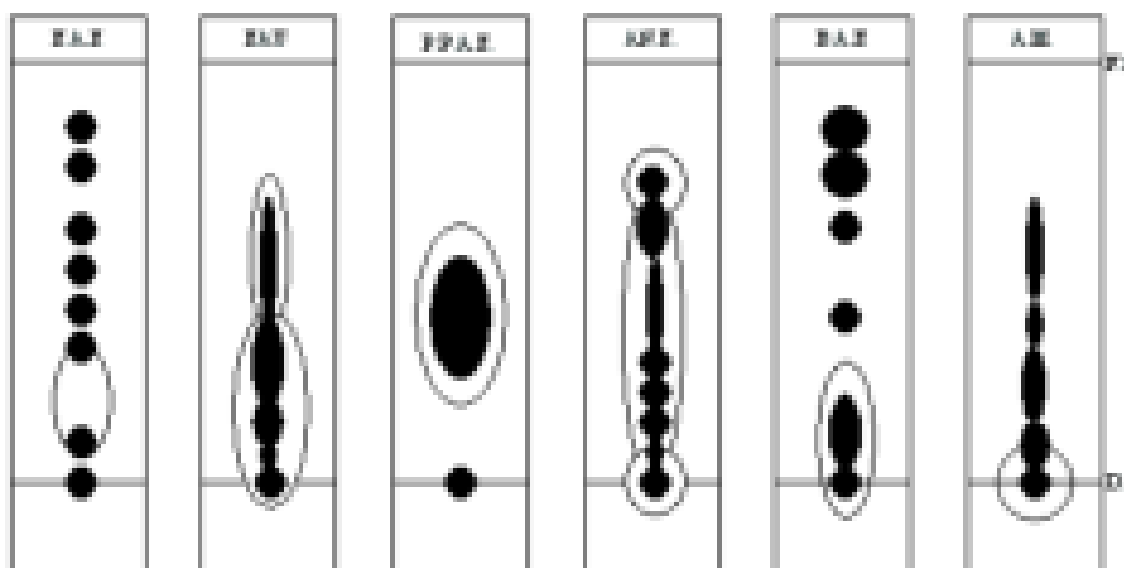
L'activité antilevurienne (contre *Saccharomyces cerevisiae*) est détectée par bioautographie dans la phase aqueuse préalablement traitée au charbon actif. Différents systèmes de solvants sont testés (figure 49). A l'exception du solvant E.A.E., dans les autres systèmes de solvants, soit la tache active ne migre pas et reste au dépôt (B.A.E. et A.M.), soit elle migre sous forme de traînée (eau pure et AN.E.). Dans le système P.P.A.E., une seule tâche active (Rf = 0,35) est détectée mais elle est confondue avec une tâche jaune-brunâtre inactive et visible à l'œil nu. Le solvant E.A.E. a permis une meilleure séparation des taches dont une est active (Rf = 0,14). Cette activité



**Figure 48.** Localisation par bioautographie des activités antibiotiques de l'extrait butanolique.

Systèmes de solvants : B.A.E., *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1 v/v); A.M., acétate d'éthyle-méthanol (100:15 v/v).

, tache active contre *Micrococcus luteus* et *Mucor ramannianus* ; , tache inactive.



**Figure 49.** Localisation par bioautographie de l'activité antilevurienne de la phase aqueuse de l'isolat Sg163.

Les solvants de migration : E.A.E., éthanol-ammoniaque-eau (8:1:1, v/v) ; P.P.A.E., *n*-propanol-pyridine-acide acétique-eau (15:10:3:10, v/v) ; AN.E., acétonitrile-eau (3:7, v/v) ; B.A.E., *n*-butanol-acide acétique-eau (3:1:1, v/v) ; A.M., acétate d'éthyle-méthanol (100:15, v/v). F.S., front du solvant ; D., dépôt.

, tache active contre *Saccharomyces cerevisiae* ; , tache inactive.

est séparée de la tache jaune-brunâtre, qui reste localisée au niveau du dépôt. La fraction antibiotique de la phase aqueuse est notée 163A. Il est à signaler que dans tous les cas, de fortes activités sont obtenues uniquement contre *Saccharomyces cerevisiae*. La phase aqueuse, après extraction butanolique, ne possède aucune activité antibactérienne ou antifongique.

### 1.4.3. Extrait méthanolique du mycélium

Les bioautographies effectuées contre *M. ramannianus*, *S. cerevisiae* et *M. luteus* pour l'extrait méthanolique du mycélium ont donné les mêmes résultats que pour le filtrat de culture. Cependant les taches sont moins bien séparées (probablement à cause des lipides cellulaires). Nous avons donc travaillé par la suite uniquement sur le filtrat de culture (phases butanolique et aqueuse).

## 1.5. Détection des antibiotiques par révélations chimiques

### 1.5.1. Fraction antibiotique présente dans la phase aqueuse

La fraction antibiotique 163A donne des réactions positives avec la ninhydrine (révélateur des amines), le naphtorésorcinol (révélateur des glucides) et la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées). Les réactions sont par contre négatives avec le formaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (révélateur des aromatiques polycycliques), le chlorure de fer ferrique (révélateurs des phénols et des acides hydroxamiques) et la nitro-4-aniline (révélateur des phénols).

### 1.5.2. Antibiotiques extraits par le *n*-butanol

Les fractions antibiotiques 163B et 163C sont révélées en rose-violacé par le naphtorésorcinol en jaune-brunâtre par le formaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, en jaune-orange par la nitro-4-aniline et en bleu pâle par le chlorure de fer ferrique. En revanche, les réactions sont négatives avec la ninhydrine.

## 1.6. Purification des antibiotiques

### 1.6.1. Semi-purification de la fraction antibiotique 163A

Pour la semi-purification de la fraction antibiotique 163A de la phase aqueuse, différents gels sont testés en chromatographies sur couches épaisses de gel de silice (système de solvant E.A.E.) et sur colonnes (de gel de silice, de Séphadex G25-80 et de Séphadex LH-20). La phase aqueuse obtenue après extraction du filtrat de culture au *n*-butanol, est fortement concentrée (aspect sirupeux) et récupérée dans un minimum d'eau pure. Pour la chromatographie sur colonne, les phases mobiles "méthanol-eau" ou eau pure seule, sont utilisées en gradient discontinu (normal et inverse) ou en isocratique afin de déterminer la phase mobile qui permet la meilleure séparation.

Les couleurs, les temps de rétention et l'aspect des fractions (trouble ou solution claire) ainsi que les activités (contre la levure *Saccharomyces cerevisiae*) sont notés.

Nous avons d'abord travaillé avec une colonne de gel de silice mais il s'est avéré que la silice est partiellement soluble dans l'eau et donc gênante lors des purifications par HPLC. Les gels de Séphadex G25-80 et LH-20 ont donné des résultats plus ou moins équivalents, permettant la séparation de plusieurs bandes. Pour des raisons pratiques (facilité d'utilisation), nous avons retenu pour la suite des travaux, le Séphadex LH-20 utilisable avec l'eau seule ou en mélange avec le méthanol comme phase mobile.

Quel que soit le programme utilisé (gradient discontinu normal ou inverse de MeOH-eau, ou en isocratique à 100%, à 75%, à 50% ou à 25%), les mêmes bandes, au nombre de cinq, sont obtenues, dont trois, BJ1, JP et BJ2, sont actives contre *S. cerevisiae*. L'élution en isocratique à 25% (durée 3 h, la plus réduite) a été retenue. Les résultats des activités des différentes bandes sont présentés dans le tableau 18.

**Tableau 18. Activités contre *Saccharomyces cerevisiae* des différentes bandes obtenues par chromatographie sur colonne de gel de Séphadex LH-20 (isocratique à 25% de MeOH-eau).**

Tubes assemblés (numéros)	Couleur (désignation)	Diamètre d'inhibition (mm)
1 à 3	Incolore (NC1)	0
4 à 7	Brun jaunâtre (BJ1)	30
8 à 11	Jaune pâle (JP)	34
12 à 15	Brun jaunâtre (BJ2)	42
16 à 20	Incolore (NC2)	0

Note. Antibiographie par la méthode des puits (8 mm de diamètre, 100 µL/puits). Le diamètre du puits est inclus dans les valeurs des diamètres d'inhibition.

### 1.6.2. Purification de la fraction antibiotique 163A par HPLC

Les extraits semi-purs BJ1, JP et BJ2 sont purifiés par HPLC en utilisant la colonne C18. Des expériences préliminaires sont toujours nécessaires pour rechercher les bonnes conditions de séparation et plusieurs réinjections du même produit sont souvent indispensables pour sa purification.

Un programme a été retenu : gradient linéaire continu de 0 à 15% MeOH-eau pendant 20 min (débit 0,6 mL/min) puis isocratique à 25% MeOH-eau (débit 1,5 mL/min). Les 3 composés BJ1, JP et BJ2 sont en fait des complexes d'antibiotiques (figure 50). Six pics actifs (notés A, B, C, G, H et I) sont obtenus pour BJ1, 2 pour JP (notés JP1 et JP2) et 9 pour BJ2 (numérotés de 1 à 9).

Lors de la purification de chaque composé par HPLC, nous avons constaté que certains d'entre eux provenant de fractions différentes (BJ1, BJ2 et JP), possèdent des temps de rétention identiques. Les similarités concernent :

- JP1 (de JP) et H (de BJ1).
- JP2 (de JP), I de BJ1) et 5 (de BJ2).
- A (de BJ1) et 1 (de BJ2).
- B (de BJ1) et 2 (de BJ2).
- G (de BJ1) et 3 (de BJ2).

Ces antibiotiques seraient probablement identiques entre eux. Ceci nous amène à penser que la colonne de Séphadex LH-20 n'a pas bien séparé les produits bioactifs entre eux puisque les produits obtenus dans JP sont aussi retrouvés dans BJ1 et BJ2 et ceux retrouvés dans BJ1 sont présents dans BJ2.

Au total, nous pouvons dire que la fraction 163A contiendrait les antibiotiques suivants : A (= 1), B (= 2), C, G, H (= JP1), I (= JP2 = 5), 4, 7, 8 et 9, soit un total d'au moins 10 antibiotiques. Il faut signaler que ces antibiotiques sont fortement complexés aux sels. De ce fait, leur purification par HPLC était très difficile et les quantités pures obtenues ont été tout juste suffisantes pour la réalisation de la spectrométrie de masse. Cette purification n'a été poursuivie que pour les antibiotiques BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8.

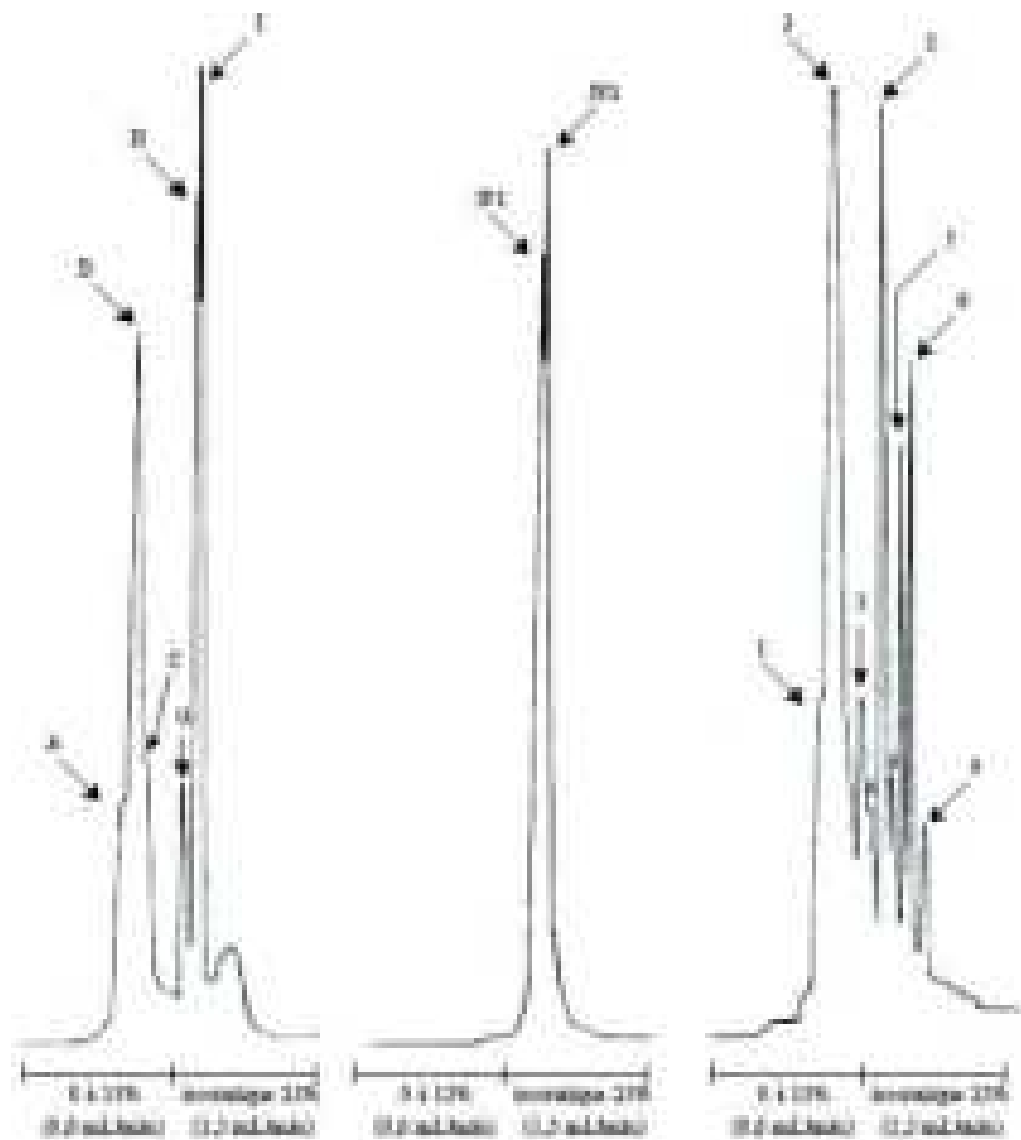
### 1.6.3. Semi-purification des fractions antibiotiques 163B et 163C

L'extrait butanolique brut issu d'environ 15 L de filtrat de culture, est semi-purifié sur plaques de gel de silice. Les résultats obtenus sur couches minces sont appliqués à la chromatographie préparative sur plaques épaisses de gel de silice (système de solvant B.A.E.). Les bandes correspondant aux fractions actives 163B, 163C et 163D sont grattées, récupérées séparément, désorbées de la silice avec du méthanol pur et concentrées à sec avant d'être purifiées par HPLC.

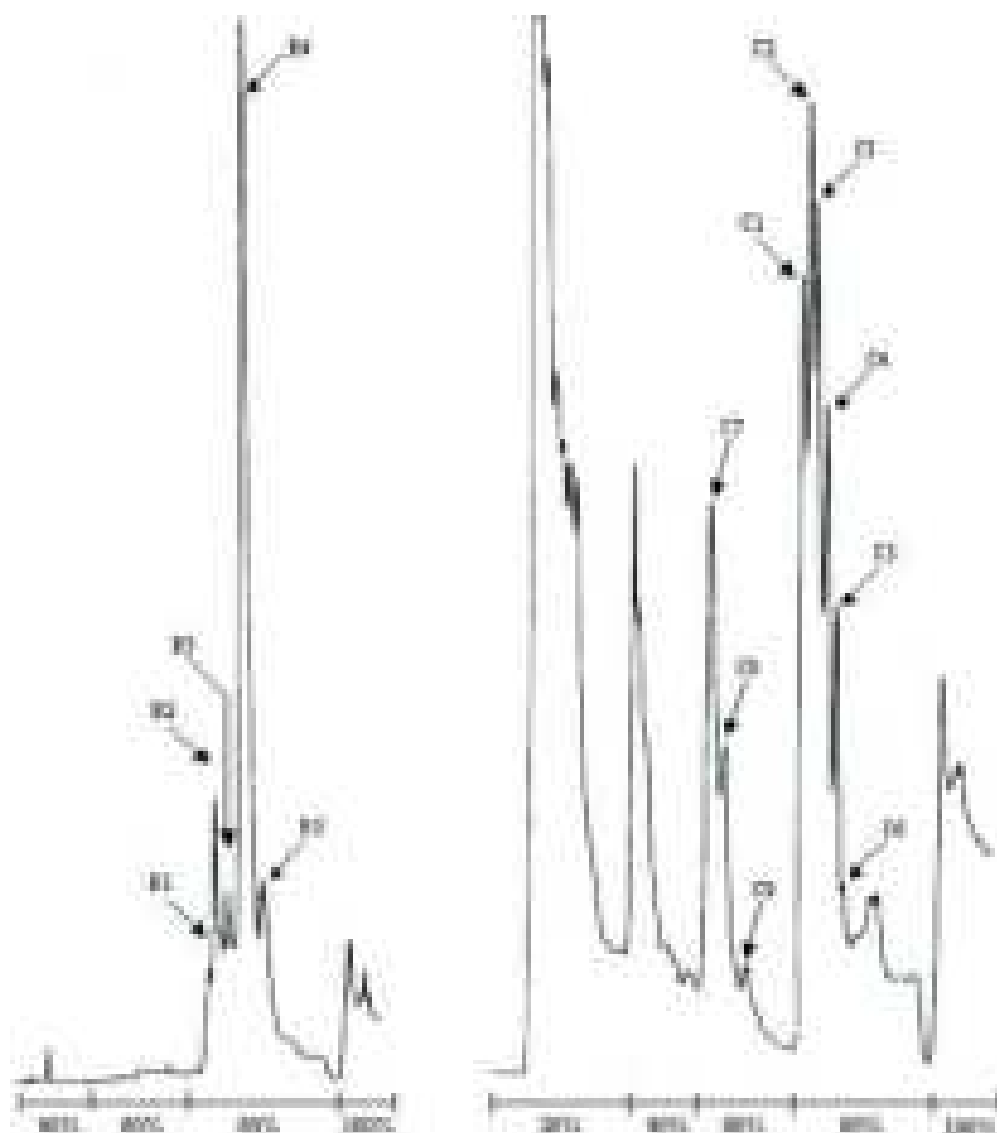
### 1.6.4. Purification des fractions antibiotiques 163B et 163C par HPLC

Seules les fractions 163B et 163C, les plus actives, ont fait l'objet d'une purification par HPLC. La fraction 163D est concentrée à sec et stockée au congélateur à l'état semi-pur. Le programme utilisé est un gradient discontinu 20, 40, 60, 80 et 100% de méthanol-eau. L'activité est obtenue à 80% pour 163B et à 60 et 80% pour 163C. 163B et 163C sont en fait deux complexes d'antibiotiques constitués de 5 et 9 produits actifs respectivement. La purification a été poursuivie pour les antibiotiques B4 de la fraction 163B et C1, C2, C3 et C7 de la fraction 163C (figure 51).





**Figure 50.** Profils d'élution en HPLC des premières injections des fractions actives BJ1, JP et BJ2 solubilisées dans de l'eau: colonne C18 semipréparative 250 × 7,8 mm, 5 µm; gradient linéaire continu de 0 à 15% de méthanol-eau pendant 20 min (débit 0,6 mL/min) puis isocratique à 25% MeOH-eau (débit 1,5 mL/min); détection à 220 nm.



**Figure 51.** Profils d'élution en HPLC des premières injections des fractions actives 163B et 163C solubilisées dans du méthanol: colonne C18 semipréparative 250 × 7,8 mm, 5 µm; gradient discontinu 20, 40, 60, 80 et 100 % de méthanol-eau; détection à 220 nm.

## 2. Discussion

Les antibiotiques ont été décelés dans le filtrat de culture et dans le mycélium de la souche Sg163 de *Streptosporangium*. La bioautographie a montré la présence d'une seule tache à activité antilevurienne dans la phase aqueuse et 3 à activités antifongique et antibactérienne dans la phase organique butanolique. L'analyse spectrophotométrique des extraits butanoliques et aqueux indique que nos molécules ne sont pas polyéniques. Les polyènes sont connus pour leur toxicité et leur instabilité. Après analyse par HPLC, trois des taches actives se sont révélées être des complexes d'antibiotiques. En effet, l'isolat Sg163 produit au moins 24 antibiotiques. Des cas similaires sont décrits dans la littérature où la même espèce peut produire plus de 30 antibiotiques. C'est le cas par exemple, des genres *Streptomyces* (Watve *et al.*, 2001), *Saccharothrix* (Zitouni, 2004b) et *Actinomadura* (Badji,

2006). Les études se sont poursuivies pour neuf molécules, quatre de la phase aqueuse et cinq de la phase organique.

## **IV. CARACTÉRISATIONS SPECTROSCOPIQUES DES FRACTIONS ANTIBIOTIQUES 163A-163B-163C**

### **1. Résultats**

#### **1.1. Spectroscopie UV-visible**

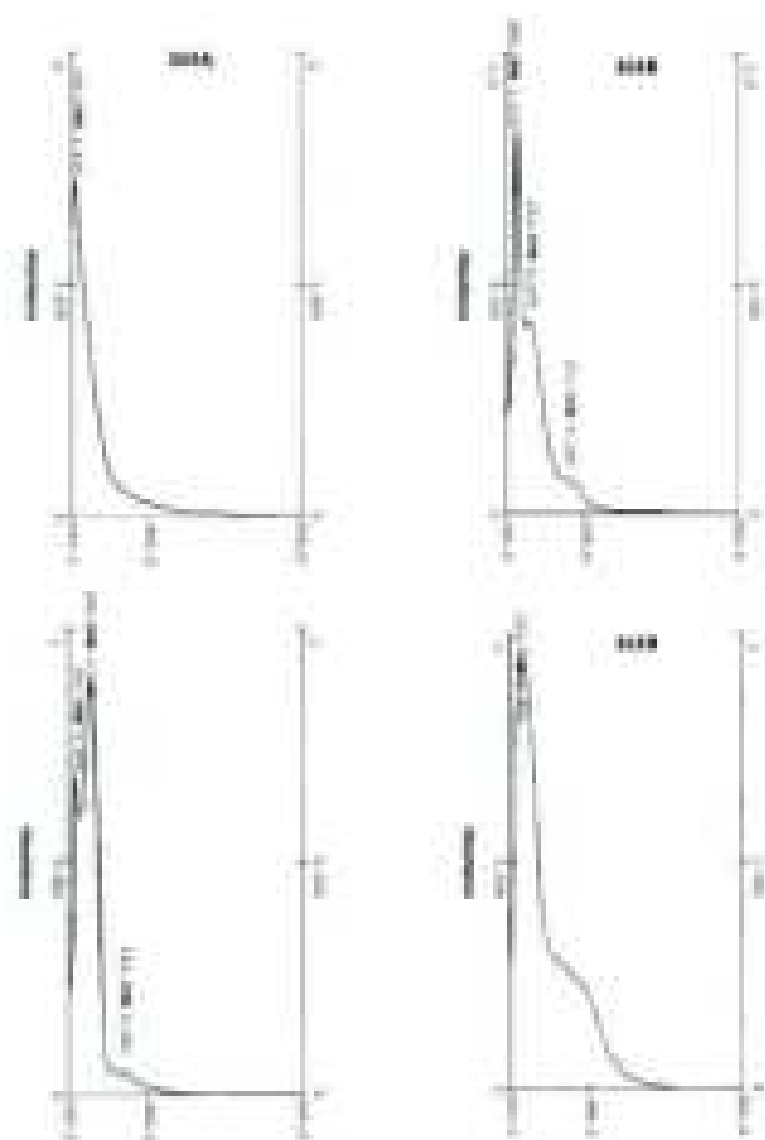
Les spectres UV-visible des fractions antibiotiques 163A, 163B et 163C semipures n'ont pas montré les pics d'absorption caractéristiques des polyènes (figure 52). L'extrait 163A absorbe à 193 nm. 163B absorbe à 204, 222 et 272 nm, et 163C à 202, 222 et 261 nm. Il en est de même pour la fraction 163D (221 nm et épaulement à 260 nm) qui est exempte de polyènes.

#### **1.2. Spectroscopie infrarouge**

Les spectres infrarouge ont été réalisés pour les 3 fractions antibiotiques semipures 163A, 163B et 163C.

##### **1.2.1. Spectre infrarouge de l'antibiotique 163A**

Le spectre infrarouge de la fraction antibiotique 163A présente des bandes d'absorption (figure 53a) à 3400 et 3200  $\text{cm}^{-1}$  indiquent la présence de fonctions OH et  $\text{NH}_2$ , détectées déjà par les révélations chimiques. Ces fonctions sont confirmées par d'autres bandes à 1620~1645  $\text{cm}^{-1}$ , 1400, 1180, 1065, 1150 et 1025  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes à 2850 et à 1480  $\text{cm}^{-1}$  montrent la présence de groupements CH du CH, du  $\text{CH}_2$  et/ou du  $\text{CH}_3$ .



**Figure 52.** Spectres d'absorption dans l'UV-visible des fractions antibiotiques 163A (dissout dans l'eau), 163B, 163C et 163D (dissous dans le méthanol).

### 1.2.2. Spectres infrarouge des fractions antibiotiques 163B et 163C

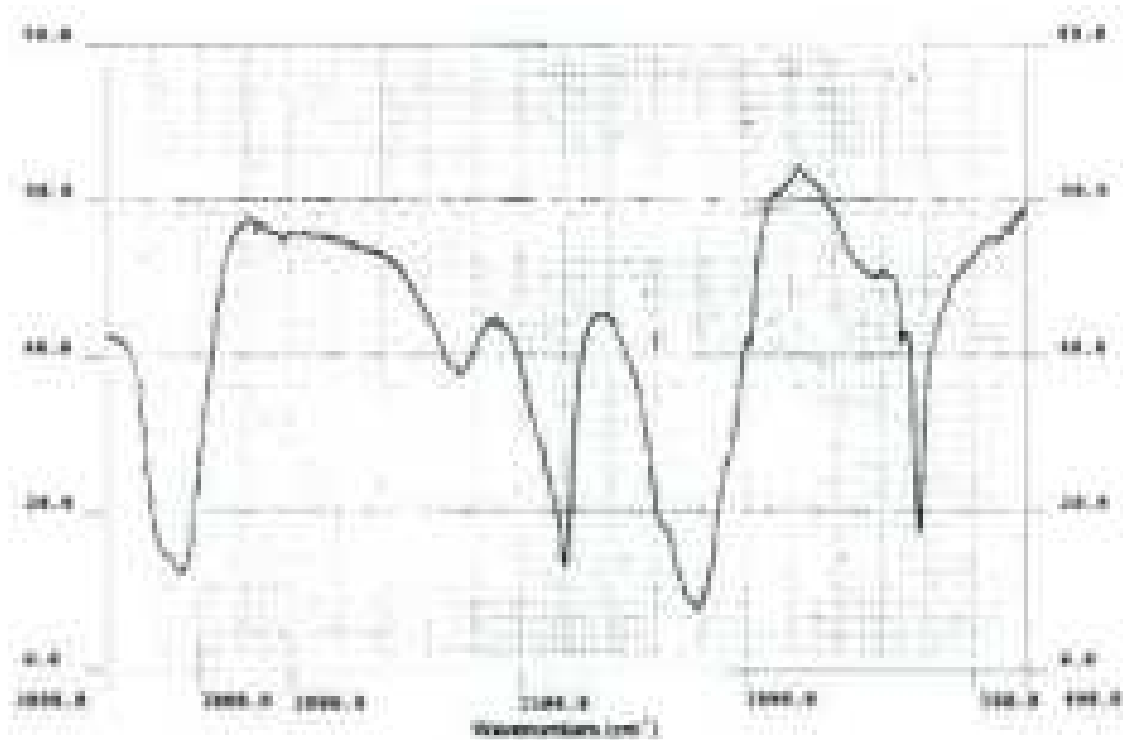
Les spectres infrarouge des fractions 163B et 163C (figures 53b et 53c) montrent que ces molécules possèdent en commun des fonctions OH ( $3450, 1375, 1130, 1120$  et  $1040\text{ cm}^{-1}$ ), des CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> ( $2950, 2925, 2850$  et  $1450\text{ cm}^{-1}$ ), une fonction COOH ou CO ( $1750-1720\text{ cm}^{-1}$ ), des cycles aromatiques avec fonction cétone ( $1635, 1670-1560\text{ cm}^{-1}$ ) et des liaisons éther.

Le spectre de 163B présente en plus des bandes à  $1280-1260$  suggérant des liaisons éther et des OH. Celui de 163C montre que cet antibiotique possède également dans sa structure des liaisons éther ( $1190$  et  $1010\text{ cm}^{-1}$ ) et un cycle benzénique di-substitué ( $830\text{ cm}^{-1}$ ) et mono-substitué ( $680-660\text{ cm}^{-1}$ ).

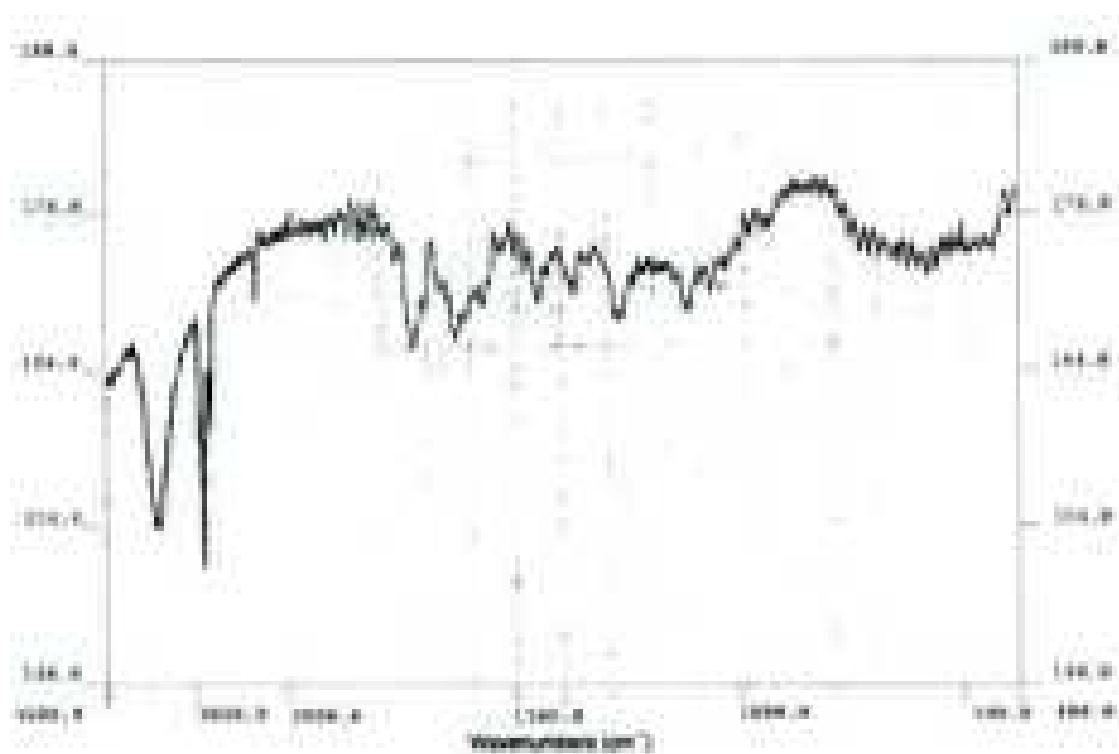
### 1.3. Spectrométrie de masse

Dans les figures 54a-i sont présentés les spectres de masse de 4 antibiotiques de 163A (BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8), celui de B4 de 163B et ceux de C1, C2, C3 et C7 de 163C. Les spectres ont été réalisés par "electrospray ionisation" en mode positif ou négatif selon les cas.

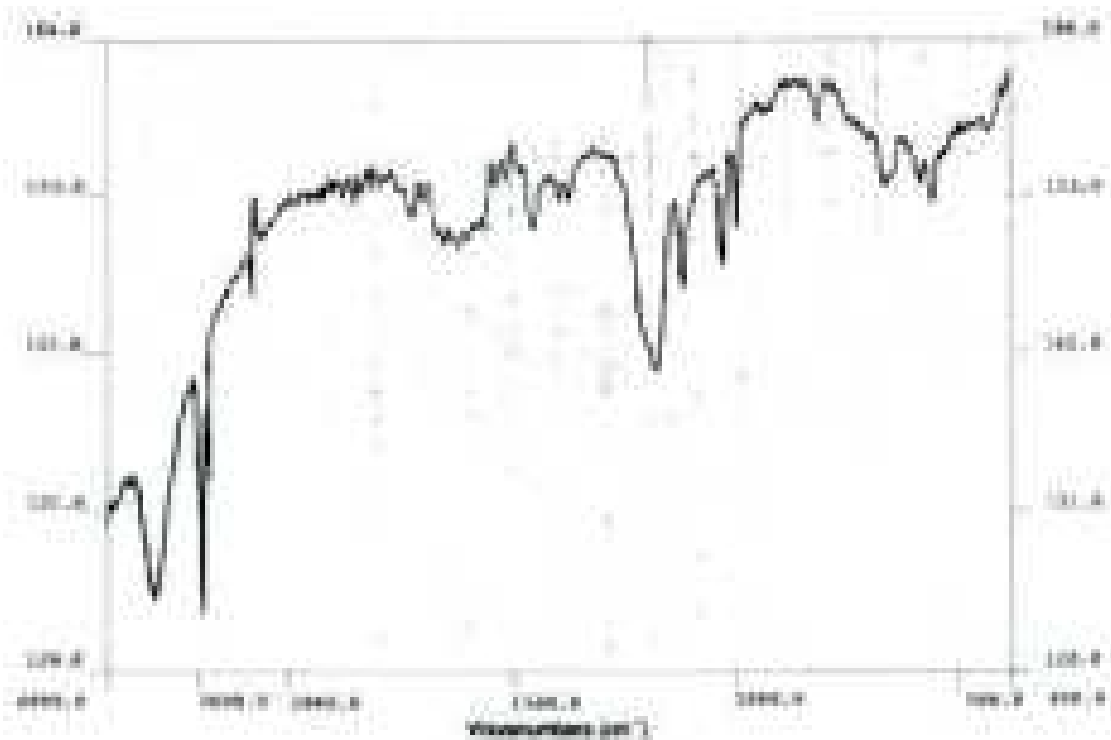
Les poids moléculaires des antibiotiques BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8 sont de 340, 358, 458 et 396 respectivement. Ceux des antibiotiques B4, C1, C2, C3 et C7 sont de 370, 328, 492, 544 et 399 respectivement.



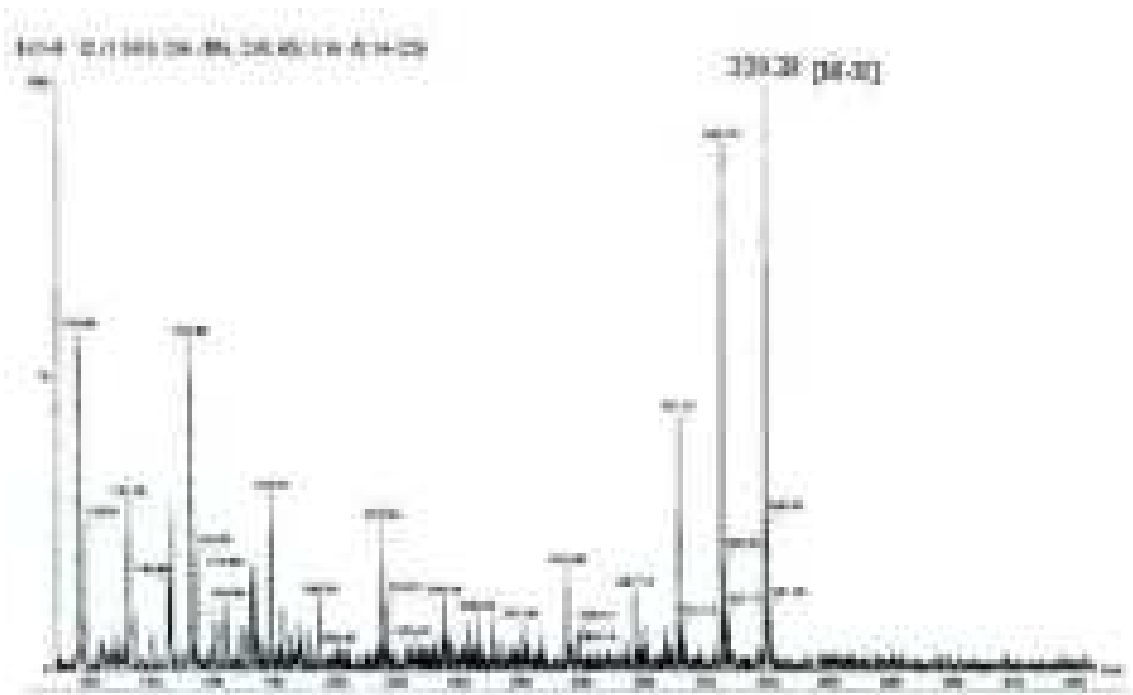
**Figure 53a.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge de la fraction 163A.



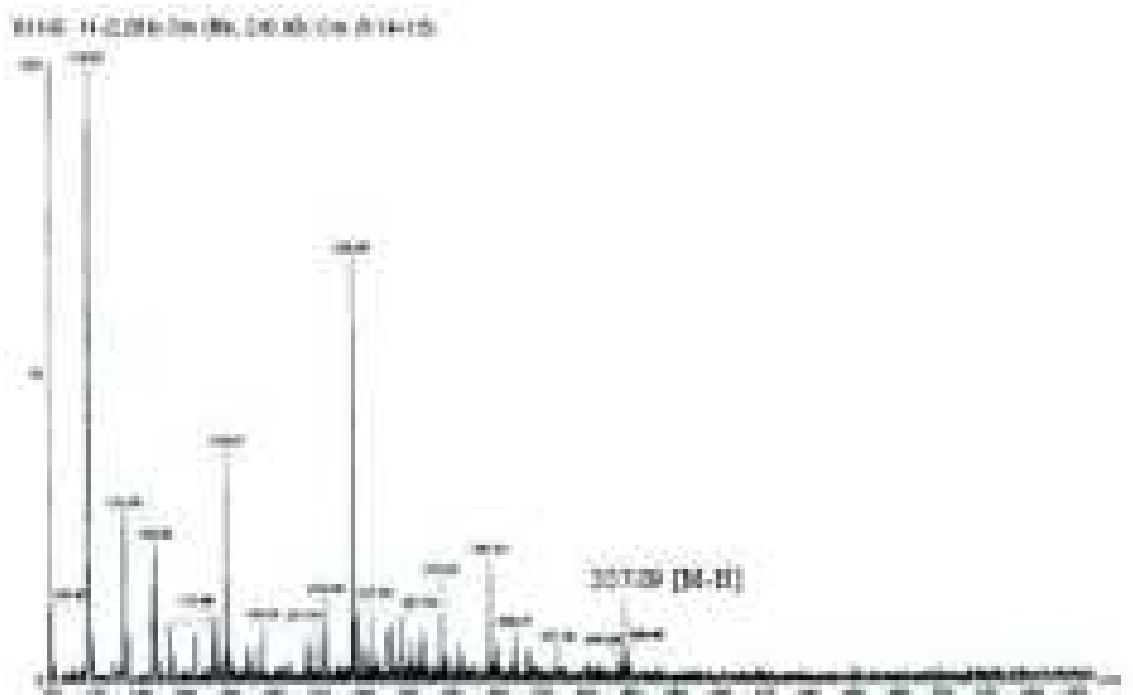
*Figure 53b.* Spectre d'absorption dans l'infrarouge de la fraction 163B.



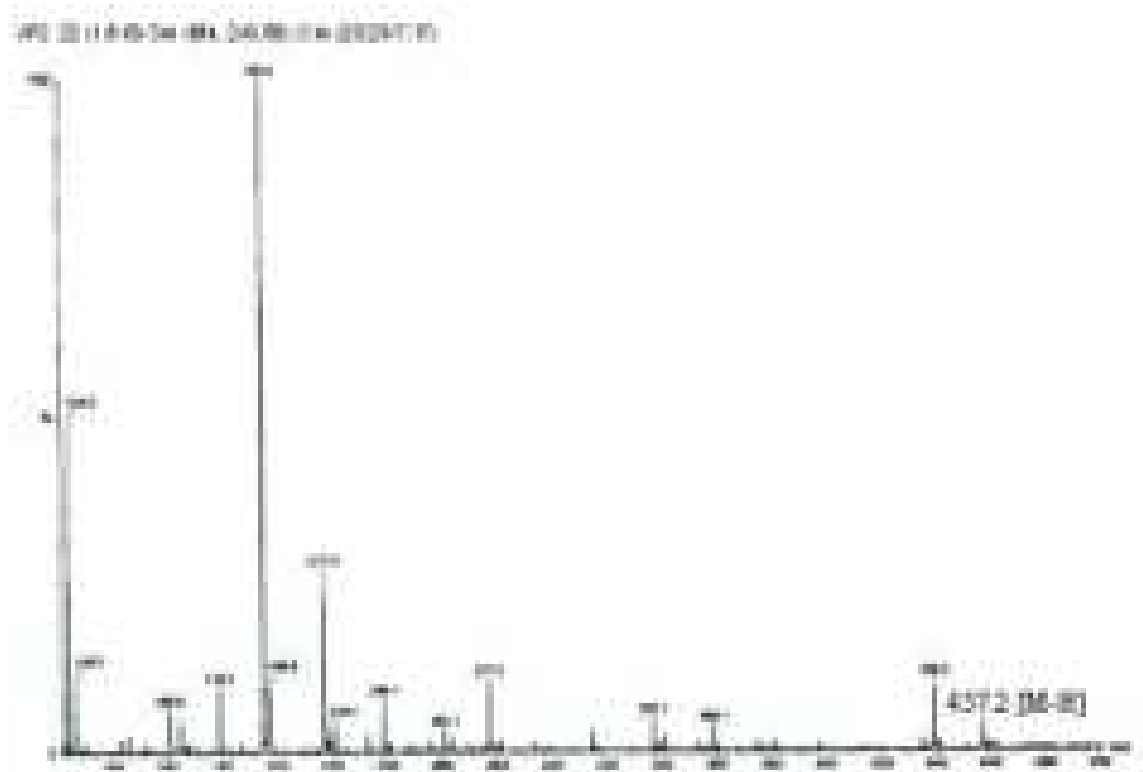
*Figure 53c.* Spectre d'absorption dans l'infrarouge de la fraction 163C.



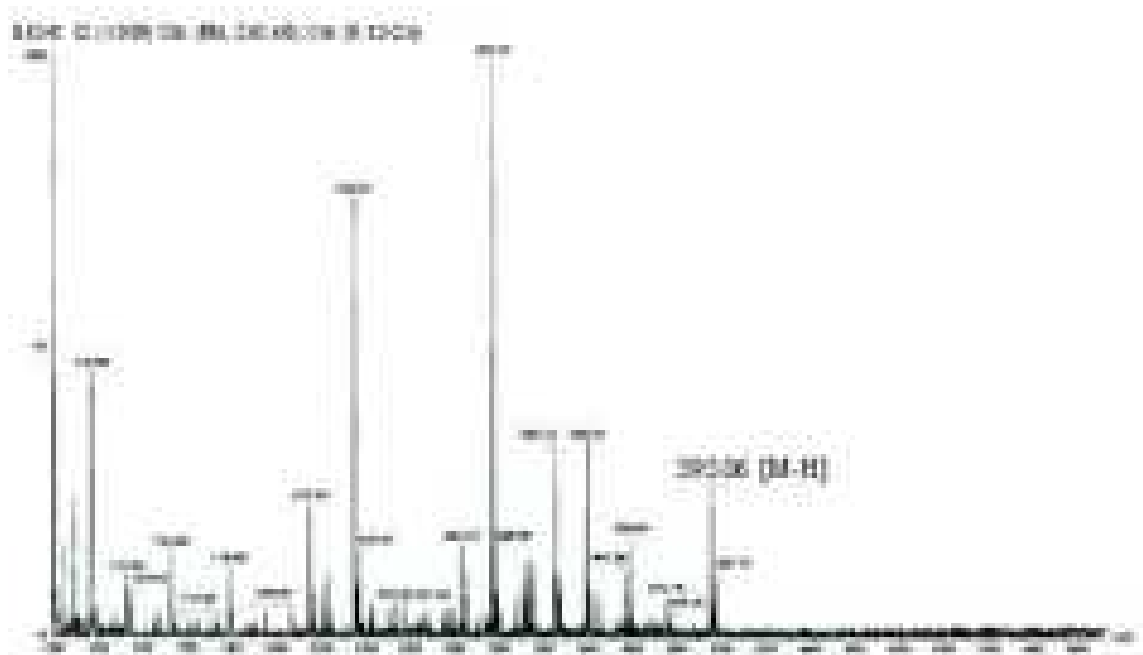
**Figure 54a.** Spectre de masse de l'antibiotique BJ1-B (electrospray ionisation, mode négatif).



**Figure 54b.** Spectre de masse de l'antibiotique BJ1-G (electrospray ionisation, mode négatif).

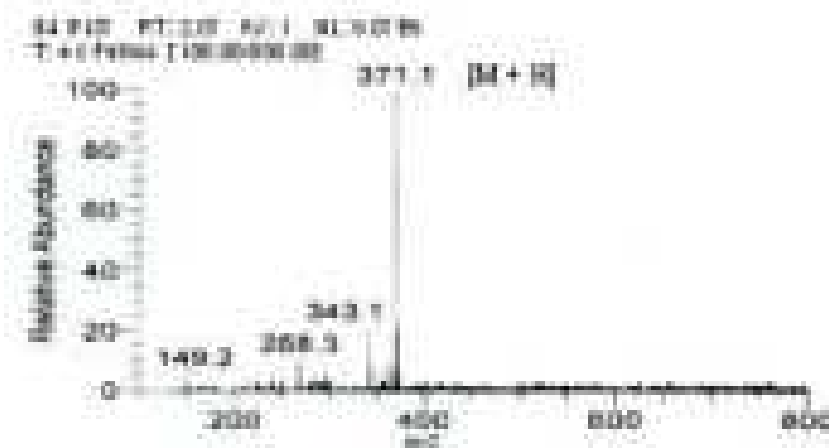


**Figure 54c.** Spectre de masse de l'antibiotique JP2 (electrospray ionisation, mode négatif).



**Figure 54d.** Spectre de masse de l'antibiotique BJ2-8 (electrospray ionisation, mode négatif).

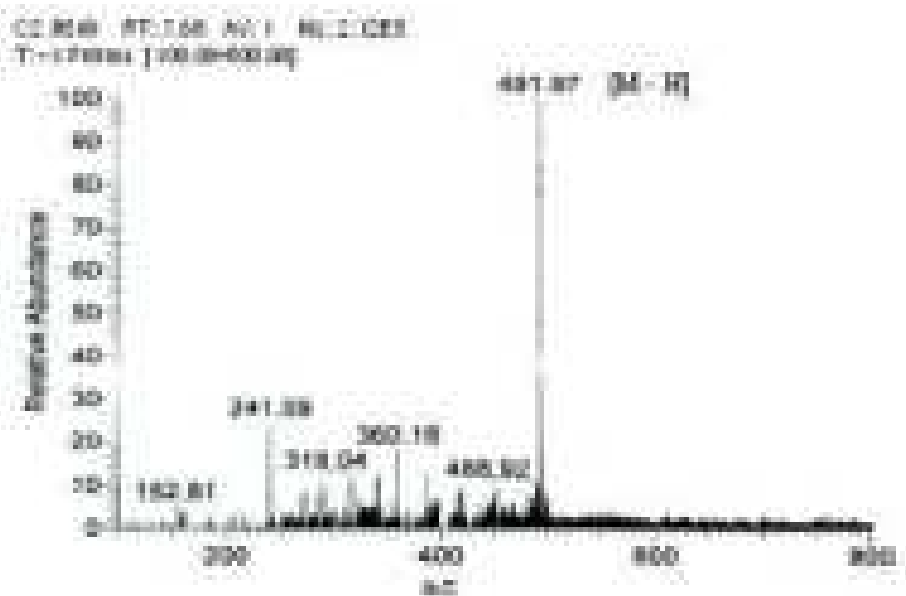




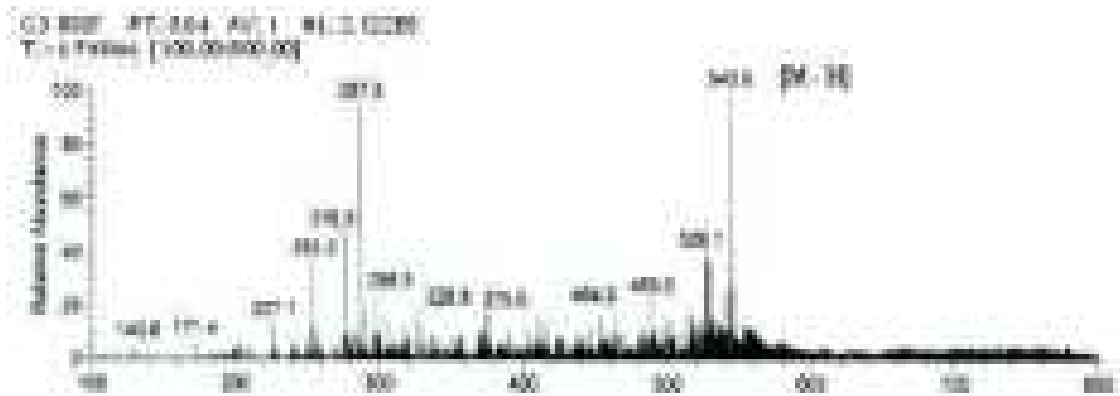
**Figure 54e.** Spectre de masse de l'antibiotique B4 (electrospray ionisation, mode positif).



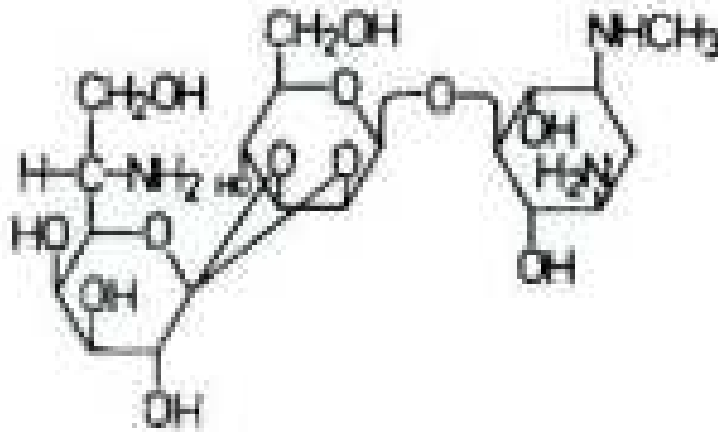
**Figure 54f.** Spectre de masse de l'antibiotique C1 (electrospray ionisation, mode négatif).



**Figure 54g.** Spectre de masse de l'antibiotique C2 (electrospray ionisation, mode négatif).



**Figure 54h.** Spectre de masse de l'antibiotique C3 (electrospray ionisation, mode négatif).



**Figure 54i.** Spectre de masse de l'antibiotique C7 (electrospray ionisation, mode positif).

## 2. Discussion

Les résultats des réactions chromogéniques montrent que le complexe 163A possède dans sa structure un à plusieurs sucres (naphtorésorcinol- $H_2SO_4$  +), des amines (ninhydrine +), des groupements hydroxyles avec possibilité de liaisons éther (vanilline- $H_2SO_4$  +). Ces résultats sont confirmés par le spectre infrarouge qui indique la présence de fonctions OH et  $NH_2$ , des groupements  $CH_3$ ,  $CH_2$  et/ou CH et des liaisons éther. Le spectre UV-visible montre que l'on est en présence de produits totalement saturés (pas d'absorption dans l'UV). Ces données suggèrent très fortement que les antibiotiques de 163A sont à classer parmi les aminoglycosides. Ces derniers sont des composés basiques fortement polaires et polycationiques dont la structure moléculaire est caractérisée par 2 ou 3 sucres aminés ou plus (groupements amines et également hydroxyles) attachés par une liaison glycosidique à un noyau aminocyclitol (Thiele-Bruhn, 2003 ; Stead, 2000). Ils sont hydrosolubles (163 A n'étant soluble que dans l'eau et le diméthylsulfoxyde).

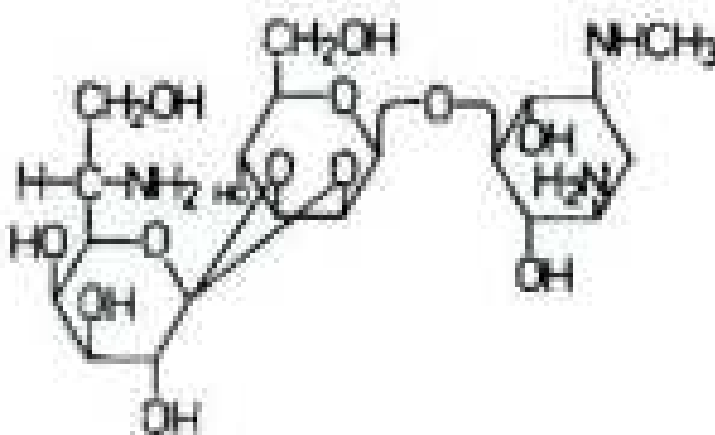
Les spectres de masse des antibiotiques BJ1-B, BJ1-G, JP2 et BJ2-8 qui composent le 163A présentent souvent en commun les fragments correspondant aux  $m/z$  359, 339,

297, 275-277, 235, 195, 179, 162, 153 et 117. Ces molécules sont donc très proches entre elles du point de vue structure chimique. Elles contiendraient probablement de la glucosamine (M= 179) et peut être aussi de la désoxystreptamine (M= 162) comme noyau aminocyclitol. Benveniste et Davies (1973) ont démontré l'existence d'une relation entre la structure et l'activité biologique (inhibition de la synthèse protéique) des antibiotiques aminoglycosidiques. Les activités les plus importantes sont observées avec ceux contenant les 1- ou 2-désoxystreptamines comme noyau aminocyclitol. Ces auteurs ont montré que le nombre et la position des groupements amines et hydroxyles dans les sucres attachés à la désoxystreptamine affecte profondément l'activité biologique de l'aminoglycoside. Cet aspect de la recherche est d'une grande importance surtout pour les aminoglycosides à intérêt médical. Par des modifications chimiques du nombre et de la position de ces groupements, leur activité pourrait être améliorée et leur toxicité réduite.

Au vu de leurs poids moléculaires assez réduits, nos antibiotiques ne contiendraient que deux ou trois sucres aminés (ou sucres aminés + sucres).

Les aminoglycosides sont principalement produits par le genre *Streptomyces*. Ils sont également sécrétés par le genre *Micromonospora*, et plus rarement par *Dactylosporangium* et *Nocardia*. Les *Streptosporangium* ne sont pas connus pour la production de ce groupe d'antibiotiques. De plus, ils sont souvent produits par les microorganismes sous forme de complexes dont les composés sont très proches entre eux (Stead, 2000), comme c'est le cas de nos molécules.

La grande majorité des aminoglycosides possèdent une activité contre les bactéries à Gram positif et négatif (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Buckingham, 1977). Certains sont antifongiques, insecticides, antihelminthes, antiviraux, anti-protazoaires ou antitumoraux. Les antibiotiques de 163A possèdent une activité strictement antilevurienne. Ils sont inactifs contre les bactéries testées à Gram positif (*Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia marcescens*) ainsi que les champignons filamenteux (*Mucor ramannianus* et *Fusarium culmorum*). Dans la littérature, seules deux molécules aminoglycosidiques produites par deux souches de *Streptomyces* possèdent une activité antilevurienne; mais elles sont différentes de nos antibiotiques par leurs masses. Le premier antibiotique H-537-SY2 est, comme nos antibiotiques, exclusivement antilevurien (Kondo *et al.*, 1976) mais son poids moléculaire est de 507. Le second, RH-5012-C (figure 55), est différent de nos antibiotiques par sa masse (M= 527) et par son activité qui est non seulement antilevurienne, mais aussi antibactérienne.



**Figure 55.** Structure chimique de l'antibiotique RH-5012-C sécrété par une souche de *Streptomyces* (Berdy et al., 1987).

En considérant leurs poids moléculaires, nos antibiotiques BJ1-B (M= 340), BJ1-G (M= 358) JP2 (M= 458) et BJ2-8 (M= 396) sont différents par leurs masses des aminoglycosides cités dans la littérature (Berdy et al., 1987; Gonzalez et al., 1998; Stead, 2000; "Dictionary of Natural Products", 2004). Les molécules les plus proches sont la fortimicine B (M= 349, figure 56) proche de BJ1-B et cinq molécules proches de JP2. Il s'agit des gentamicines A2 (figure 56) et C3 (M= 455 et 463 respectivement), de la mutamicine 4 (M= 463) et des seldomycines 1 et 3 (M= 454 et 453 respectivement). Ces six molécules sont à activité antibactérienne uniquement. La fortimicine B est composée d'un sucre et d'un noyau aminocyclitol. La gentamicine A2 est composée de 2 sucres (glucosamine et gentosamine) et d'un noyau aminocyclitol de type désoxystreptamine.



**Figure 56.** Structures chimiques de la fortimicine B (Stead, 2000) et de la gentamicine A2 (Berdy et al., 1987).

Les études sur les antibiotiques du complexe 163A méritent d'être poursuivies en raison de leur puissante activité antilevurienne particulièrement contre les souches de *Candida albicans*. Les analyses de la RMN du proton et du carbone 13 permettront à l'avenir de déterminer la structure de ces antibiotiques.

Les antibiotiques B4, C1, C2, C3 et C7 de la phase organique présentent des similitudes concernant les réactions chromogéniques, les spectres UV-visible, leur activité biologique et leur solubilité (solubles dans le *n*-butanol et le méthanol). Ils sont révélés positivement par le naphthorésorcinol (révélateur des glucides), par le formaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (révélateur des aromatiques polycycliques) et par la nitro-4-aniline et le chlorure de fer ferrique (révélateurs des phénols). Les réactions avec la ninhydrine sont par contre négatives indiquant l'absence d'amines. Les révélations chimiques ainsi que les données des spectres UV-visible et infrarouge montrent qu'ils sont constitués par un ou plusieurs sucres, des noyaux phénoliques et probablement d'autres noyaux aromatiques, ce qui nous oriente vers le groupe des antibiotiques aromatiques glycosylés.

Les aromatiques glycosylés constituent un vaste groupe de molécules naturelles. Les antibiotiques B4, C1, C2, C3 et C7 ont été d'abord comparés aux antibiotiques sécrétés par les souches de *Streptosporangium*. Seules la sibiromycine et les sinéfungines sont des aromatiques glycosylés. La sibiromycine sécrétée par *Sg . sibiricum* (Hurley et al., 1979a et b) diffère de nos antibiotiques par son activité, qui est seulement antibactérienne, son spectre UV-visible ( $\lambda_{max}$  = 230 et 310 nm) et son spectre infrarouge. Les sinéfungines sont des antibiotiques de nature peptidyl-nucléoside (Cooper et al., 1990) produites par *Streptosporangium* sp. et possédant seulement une activité antifongique.

Sur la base de leurs poids moléculaires, les antibiotiques B4, C1, C2, C3 et C7 (M= 370, 328, 492, 544 et 399 respectivement) sont également comparés aux aromatiques glycosylés dont les descriptions sont disponibles dans la littérature (Umezawa, 1988; Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Takizawa *et al.*, 1995; Buckingham, 1997 et " Dictionary of Natural Products ", 2004, Heterocycles, 2004). La majorité des aromatiques glycosylés sécrétés par les actinomycètes, principalement par les espèces de *Streptomyces*, possèdent seulement une activité antibactérienne. Les quelques molécules actives contre les bactéries et les champignons sont différentes par leur masse, leur couleur et leurs spectres UV-visible.

La comparaison des caractéristiques de nos antibiotiques avec celles des aromatiques glycosylés cités dans la littérature ne nous a pas permis de les identifier. Des analyses telles la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 sont nécessaires pour déterminer leurs structures et confirmer ou infirmer leur originalité. Les travaux de recherche sur ces molécules et sur celles non encore étudiées doivent être poursuivis en raison de leurs activités intéressantes sur les champignons phytopathogènes et toxigènes.

## ÉTUDE TAXONOMIQUE ET DES ANTIBIOTIQUES DE L'ISOLAT D'ACTINOMYCÈTE SG10

### I. TAXONOMIE DE L'ISOLAT SG10

L'isolat Sg10 a été isolé à partir d'un échantillon de sol de Béni-Abbès, sur le milieu « chitine-vitamines B-agar » additionné de 25 µg/mL de kanamycine.

#### 1. Détermination du genre

##### 1.1. Caractéristiques culturelles et micromorphologiques

Les colonies de l'isolat Sg10, cultivé sur divers milieux à 30°C pendant 14 jours, sont circulaires et lisses avec un diamètre de 5-10 mm. Sa croissance est bonne sur les milieux ISP2 et OYG et modérée sur ISP3 et ISP4. Le mycélium du substrat (MS) est stable et ne se fragmente pas. Le mycélium aérien (MA) est blanc-rosâtre. Celui du substrat est brun jaunâtre. Le MA produit des sporanges globuleux de 4-8 µm de diamètre, contenant chacun une seule chaîne spiralée de spores non mobiles (figure 57). Les sporangiospores sont sphériques ou ovoïdes, de 1-2 µm de diamètre. Aucun pigment diffusible n'est produit sur tous les milieux utilisés.



**Figure 57.** Micromorphologie en microscopie électronique à balayage de l'isolat Sg10 cultivé pendant 14 jours à 30°C sur milieu ISP2.

## 1.2. Etude chimiotaxonomique

L'étude chimiotaxonomique de l'isolat Sg10 montre la présence de l'isomère DL de l'acide diaminopimélique (*meso* DAP) dans sa paroi cellulaire, mais pas de glycine. L'analyse des hydrolysats cellulaires a permis de détecter le madurose comme sucre caractéristique, ainsi que le glucose, le galactose, le ribose et des traces de mannose. Ceci correspond au chimiotype III B tel que défini par Lechevalier et Lechevalier (1970). Les phospholipides sont de type PIV caractérisé par la présence de la phosphatidyléthanolamine et des phospholipides à structure non connue mais contenant de la glucosamine (Lechevalier *et al.*, 1977).

## 1.3. Identification du genre

Sur la base des caractères morphologiques (présence de mycélium aérien, présence de sporanges sphériques à spores rondes non mobiles) et chimiques (paroi de type III B, phospholipides de type PIV), l'isolat Sg10 est rattaché au genre *Streptosporangium* (Nonomura, 1989).

## 2. Détermination de l'espèce

La détermination des espèces est basée sur les critères physiologiques et moléculaires.

### 2.1. Étude physiologique

Le tableau 19 illustre les résultats des tests physiologiques de l'isolat Sg10. Les tests sont positifs pour 28 composés et négatifs pour 38 autres. Les pigments mélanoïdes ne sont pas produits sur ISP6 et ISP7.

---

La comparaison des caractéristiques culturales et physiologiques de la souche Sg10 avec celles des espèces de référence de *Streptosporangium* indique que *Streptosporangium carneum* est la plus proche. Les deux souches ont la même couleur des mycéliums aérien et du substrat, la taille des sporanges, la forme des spores et quelques caractères physiologiques tels que la dégradation de l'adonitol, le galactose, le glycérol et l'inositol, la croissance à 42°C, l'absence de production d'iodinine et la réduction des nitrates. Cependant, des différences significatives (17 différences) sont enregistrées entre les deux souches. Ces différences concernent la dégradation de l'arabinose, le maltose, le mannitol, le rhamnose, le saccharose, le xylose, la dextrine, l'esculine, la gélatine, l'amidon et la testostérone et la décarboxylation des propionate et succinate de sodium, ainsi que la résistance à la gentamicine, la pénicilline, la streptomycine et la rifampicine.

De plus, les hydrolysats cellulaires de *S. carneum* contiennent de l'arabinose (en plus du madurose et du mannose), lequel n'a pas été détecté chez l'isolat Sg10 (Mertz et Yao, 1990).

## 2.2. Étude moléculaire: séquençage de l'ADNr 16S et phylogénie

Le séquençage de la fraction 16S de l'ADN ribosomique a permis de déterminer une séquence de 1446 nucléotides. Cette séquence a été comparée avec celles des espèces de référence de bactéries contenues dans les bases de données génomiques. Les résultats du "BLAST" confirment l'appartenance de l'isolat Sg10 au genre *Streptosporangium* et montrent un taux de similitude

Tableau 19. Caractéristiques physiologiques de l'isolat Sg10.

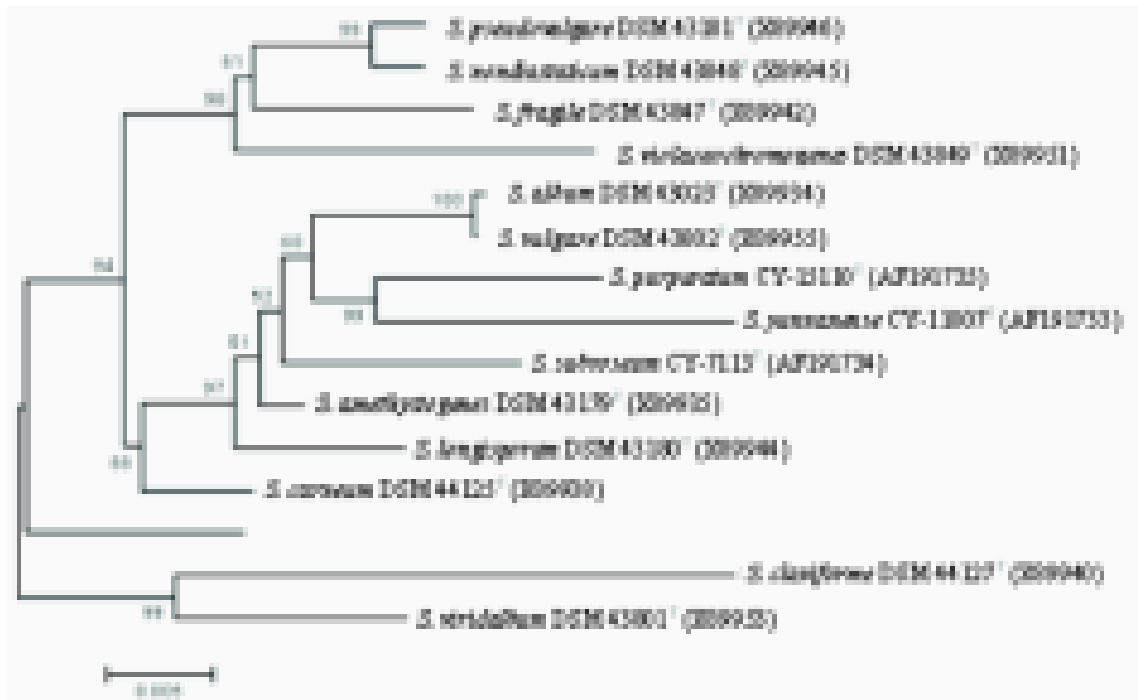
## Étude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens

Tests	Réaction	Tests	Réaction
Dégradation de :		Réduction des nitrates	-
Adénine	-	Décarboxylation des sels de sodium :	
Arbutine	+	Acétate	+
Caséine	+	Benzoate	-
Esculine	+	Butyrate	-
Gélatine	+	Citrate	-
Amidon	+	Oxalate	-
Testostérone	-	Propionate	+
Tween 80	-	Pyruvate	+
Tyrosine	+	Succinate	+
Xanthine	-	Tartrate	-
Adonitol	-		
Arabinose	+	Résistance aux antibiotiques (mg/l) :	
Cellobiose	+	Chloramphénicol (25)	-
Dextrine	+	Cyclosérine (10)	-
Dulcitol	-	Erythromycine (10)	-
Erythritol	-	Gentamicine (5)	-
Fructose	+	Kanamycine (25)	+
Galactose	+	Novobiocine (10)	-
Glucose	+	Oxytétracycline (25)	-
Glycérol	-	Pénicilline (25)	-
Hypoxanthine	-	Rifampicine (5)	+
Inositol	-	Streptomycine (10)	-
Lactose	+	Vancomycine (5)	-
Maltose	+		
Mannitol	+	Croissance en présence de :	
Mannose	+	Crystal violet (0,05% w/v)	-
Mélibiose	-	Lysozyme (0,005% w/v)	-
□-méthyl-D-Glucoside	-	Phénol (1,5% w/v)	-
Raffinose	-	Tellurite de potassium	
Rhamnose	+	(0,005% and 0,01% w/v)	+
Ribose	-	Azide de sodium (0,001% w/v)	-
Saccharose	+	Chlorure de sodium (2% w/v)	+
Sorbitol	-	Croissance à :	
Tréhalose	+	42°C	-
Xylose	+	pH 5	-
Production de pigment mélanoïde	-	pH 9	-

**Note.** +, test positif; -, test négatif.

allant de 96,3% à 97,8%, *Streptosporangium carneum* DSM 44125T étant la plus proche. L'analyse phylogénique par la méthode du "neighbor joining" montre la position de l'isolat Sg10 et sa relation avec les souches types de *Streptosporangium* (figure 58). L'arbre phylogénique obtenu montre que l'isolat Sg10 se détache nettement de toutes les espèces connues et constitue ainsi une lignée phylétique distincte suggérant très fortement une nouvelle espèce.





**Figure 58.** Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat Sg10 et les souches-types des espèces du genre *Streptosporangium*.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les pourcentages du support « bootstrap » effectués par la méthode du « neighbor-joining ». Ne sont donnés que les pourcentages supérieurs à 50%. La barre indique 0,005 substitutions par position de nucléotide. Les numéros des séquences des souches sont donnés entre parenthèses.

### 3. Conclusion

Les résultats des études morphologique, chimique et phylogénique ont permis d'identifier l'isolat Sg10 au genre *Streptosporangium*. Cet isolat n'a pu être rattaché à aucune des espèces connues de *Streptosporangium*. L'espèce *S. carneum* la moins différente reste cependant assez distincte. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que l'isolat Sg10 représente une nouvelle espèce. L'hybridation ADN-ADN avec *S. carneum* (travail en cours) devrait confirmer son originalité.

## II. ÉTUDE DES ANTIBIOTIQUES SÉCRÉTÉS PAR L'ISOLAT SG10

### 1. Mise en évidence de l'activité antibiotique

#### 1.1. Mise en évidence en milieu solide

Les résultats de l'activité antibiotique par la méthode des stries croisées sont présentés dans le tableau 20. L'isolat Sg10 présente une bonne activité contre les bactéries à Gram positif testées. Aucune activité n'est enregistrée contre les bactéries à Gram négatif, à l'exception de *Pseudomonas fluorescens* qui est faiblement inhibé. L'isolat présente également une activité moyenne contre certains champignons filamenteux tels que *Fusarium culmorum*,

*Mucor ramannianus* NRRL 1829, *Pythium irregulare* et *Sclerotium sclerotiorum*. Parmi les levures testées, seule *Saccharomyces cerevisiae* a été affectée.

## 1.2. Cinétique de production des antibiotiques en milieu liquide ISP2

Au cours de la fermentation, la production d'antibiotiques et le pH sont mesurés. Leur évolution au cours du temps est représentée dans la figure 59. Les activités antibactérienne et antifongique sont détectées le quatrième jour de fermentation. Elles atteignent le maximum le huitième jour. L'activité antibactérienne est plus forte que l'activité antifongique. De légères variations du pH sont enregistrées.

## 2. Extraction et purification des antibiotiques de l'isolat Sg10

### 2.1. Extraction des activités antibiotiques

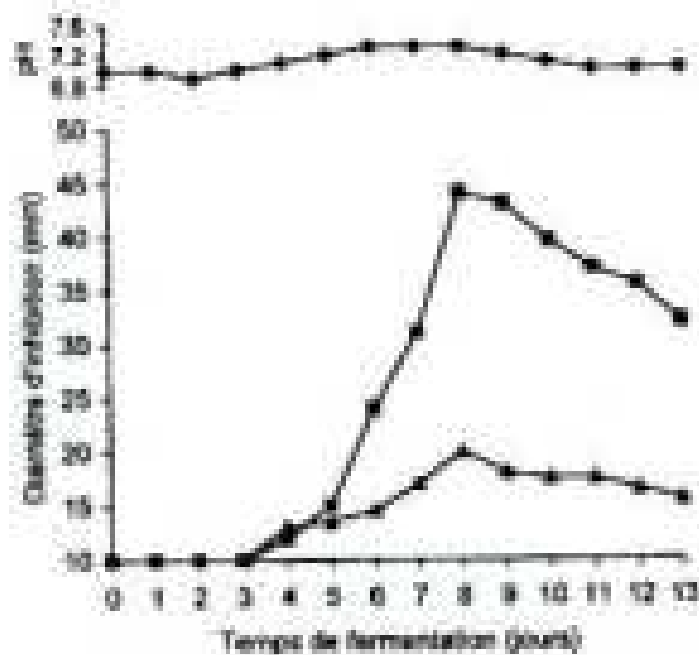
Cinq solvants de polarités différentes (*n*-hexane, benzène, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont testés pour l'extraction des activités antibiotiques. Des aliquotes de 100 mL de filtrat de culture sont extraites chacune par un volume égal de solvant. Les extraits organiques et aqueux sont concentrés à sec puis récupérés dans 2 ml de solvant pour être testés par la méthode des disques de papier (60 µL par disque) contre *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226 et *Mucor ramannianus* NRRL 1829. Les phases aqueuses ainsi que l'extrait organique au *n*-hexane sont inactifs. La figure 60 montre que les activités antibiotiques contre les 4 germes-cibles sont obtenues dans l'extrait au *n*-butanol. L'extrait à l'acétate d'éthyle ne contient que les activités contre *M. luteus* et *M. ramannianus*. Les extraits au dichlorométhane et au benzène n'ont révélé que l'activité contre *M. luteus*. Pour la suite du travail, le *n*-butanol ayant donné les meilleurs résultats, a été retenu comme solvant d'extraction pour 5 L de filtrat de culture.

Tableau 20. Activité antibiotique de l'isolat Sg10.

Microorganismes-tests	Distance d'inhibition (mm)
Bactéries à Gram positif	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	36
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	41
bactéries à Gram négatif	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF11	3
Levure	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	6
Champignons filamenteux	
<i>Fusarium culmorum</i> F3288	1
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	12
<i>Pythium irregulare</i> PY120	9
<i>Sclerotium sclerotiorum</i> S358	3

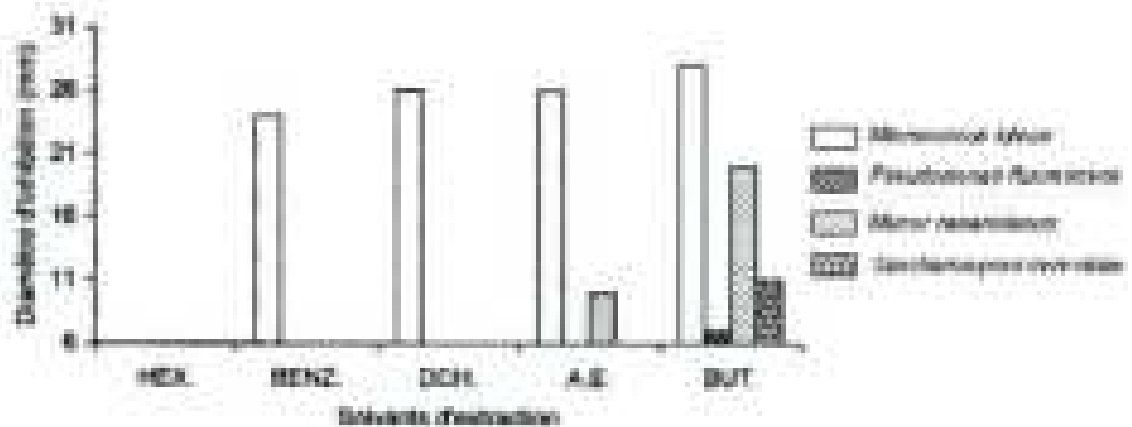
**Note.** Les microorganismes suivants ne sont pas inhibés par l'isolat Sg10 : *Agrobacterium tumefaciens* A2410, *A. vitis* A964, *Erwinia amylovora* E1994, *E. carotovora* subsp. *carotovora* E1336, *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* X1119, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Serratia marcescens* SM80, *Candida albicans* IPA 200, *C.*

*albicans* IPA 224, *Kluyveromyces lactis* K231, *Rhodotorula mucilaginosa* R254, *Botrytis cinerea* B354, *Geotrichum candidum* G669 et *Penicillium* sp.



**Figure 60.** Activités des différents extraits organiques.

Les valeurs représentent les diamètres des zones d'inhibition (en mm) y compris celui des disques (6mm). Chaque disque a reçu 60  $\mu$ L de l'extrait.



**Figure 60.** Activités des différents extraits organiques.

Les valeurs représentent les diamètres des zones d'inhibition (en mm) y compris celui des disques (6mm). Chaque disque a reçu 60  $\mu$ L de l'extrait.

Les activités antibiotiques sont également extraites (au méthanol) à partir du mycélium, mais sont faibles comparées à celles du filtrat de culture.

## 2.2. Détection et purification des antibiotiques

Les antibiotiques sont détectés par CCM sur gel de silice G60 et purifiés par chromatographie préparative sur plaques de gel de silice et par HPLC.

### 2.2.1. Détection et semi-purification des antibiotiques

Les activités antibiotiques sont d'abord détectées sur plaque de gel de silice. La phase organique active est concentrée à sec, récupérée dans du méthanol et analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice (système *n*-butanol-acide acétique-eau (B.A.E.); 3:1:1 en volumes). Quatre taches actives désignées Sg10A, Sg10B, Sg10C et Sg10D sont détectées par bioautographie (figure 61) à des valeurs  $R_f$  de 0,74, 0,68, 0,61 et 0,36 respectivement. Les antibiotiques Sg10B et Sg10D ont montré des activités antifongiques et antibactériennes fortes et faibles respectivement, alors que les antibiotiques Sg10A et Sg10C ont présenté une activité antibactérienne (forte et moyenne respectivement) uniquement.

Les quatre antibiotiques sont fortement solubles dans le *n*-butanol et le méthanol.

Une fois localisés, les antibiotiques sont semi-purifiés par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice. L'extrait brut butanolique est alors spoté en bande. Les plaques sont développées dans le B.A.E. Les quatre bandes actives correspondant aux antibiotiques A, B, C et D sont récupérées séparément, désorbées dans le méthanol, concentrées à sec et stockées au congélateur avant d'être analysées par HPLC.

### 2.2.2. Purification des antibiotiques par HPLC

La purification finale par HPLC a porté uniquement sur l'antibiotique Sg10B ayant montré une forte activité antifongique et antibactérienne. Les conditions de travail sont les suivantes : phase inverse, gradient discontinu de 20, 40, 60, 80 et 100% de méthanol-eau (20 min pour chacun). Le pic actif est décelé après 58 min à 80% de méthanol-eau (figure 62).

Cette fraction est alors récupérée séparément, concentrée à sec et réinjectée jusqu'à sa purification totale. L'antibiotique pur Sg10B est incolore et présente une activité antifongique et antibactérienne assez forte.

## 3. Caractérisation partielle de l'antibiotique Sg10B

### 3.1. Révélation chimiques

L'antibiotique Sg10B est révélé positivement par le naphthorésorcinol (rose violacé), la nitro-4-aniline (jaune orange), le chlorure de fer ferrique (bleu pâle), la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (gris violacé) et le formaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (brun). Le test à la ninhydrine est négatif, ce qui montre l'absence d'amines libres. Ces résultats suggèrent que la molécule Sg10B contient un ou plusieurs sucres, des noyaux phénoliques et probablement d'autres noyaux aromatiques.

### 3.2. Spectroscopie en UV-visible

Les spectres UV-visible de l'extrait butanolique brut ( $\lambda_{max}$  à 206 et 260 nm) et de l'antibiotique Sg10B ( $\lambda_{max}$  à 201, 222 et 261 nm) sont présentés dans la figure 63. L'absence des trois maxima caractéristiques des polyènes (Dinya et Sztaricskai, 1986) indique que les antibiotiques ne sont pas polyéniques. Les polyènes sont connus pour leur toxicité et leur instabilité, et sont de ce fait écartés des programmes de recherche des nouveaux antifongiques. Le maximum à 260-261 nm confirme la présence de noyaux aromatiques.

### 3.3. Spectroscopie infrarouge

Le spectre infrarouge de l'antibiotique Sg10B (figure 64) indique la présence de bandes à ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3450, 2950, 2925, 2850, 1740-1720, 1670 à 1540, 1520, 1460-1450, 1410-1400, 1375, 1220-1190, 1130, 1040, 1010, 830, 690-670, 610 et 580. Les bandes les plus importantes sont soulignées.

Ce spectre révèle la présence de :

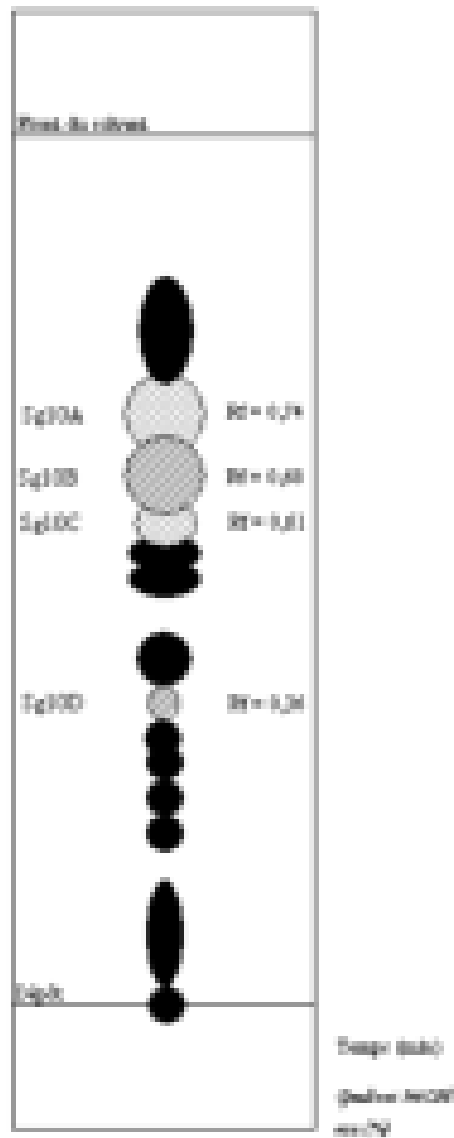
Fonctions hydroxyles (bandes à  $3450 \text{ cm}^{-1}$ , 1410, 1375 et entre 1040 et  $1130 \text{ cm}^{-1}$ ).

Groupements  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  et/ou  $\text{CH}$  (bandes entre 2850 et 2950, et entre 1450 et  $1460 \text{ cm}^{-1}$ ).

Cycles aromatiques (zone entre  $1520$  et  $1670 \text{ cm}^{-1}$ ).

Liaisons éther de type C O C (bandes à 1190-1220 et à  $1010 \text{ cm}^{-1}$ ).

Cycles benzéniques, di- et monosubstitués (bandes à  $830 \text{ cm}^{-1}$  et à 690-670  $\text{cm}^{-1}$  respectivement).



**Figure 61.** Localisation des activités antibiotiques par bioautographie de l'extrait organique. Système de solvant : *n*-butanol

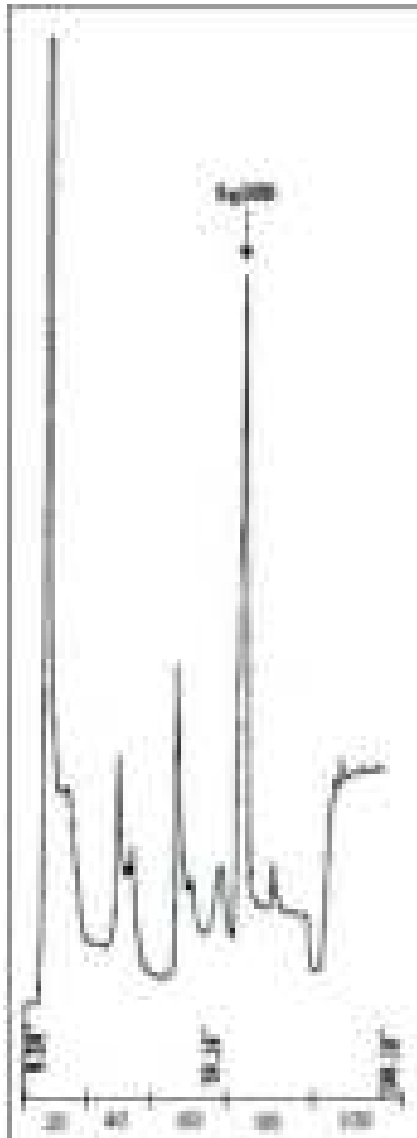
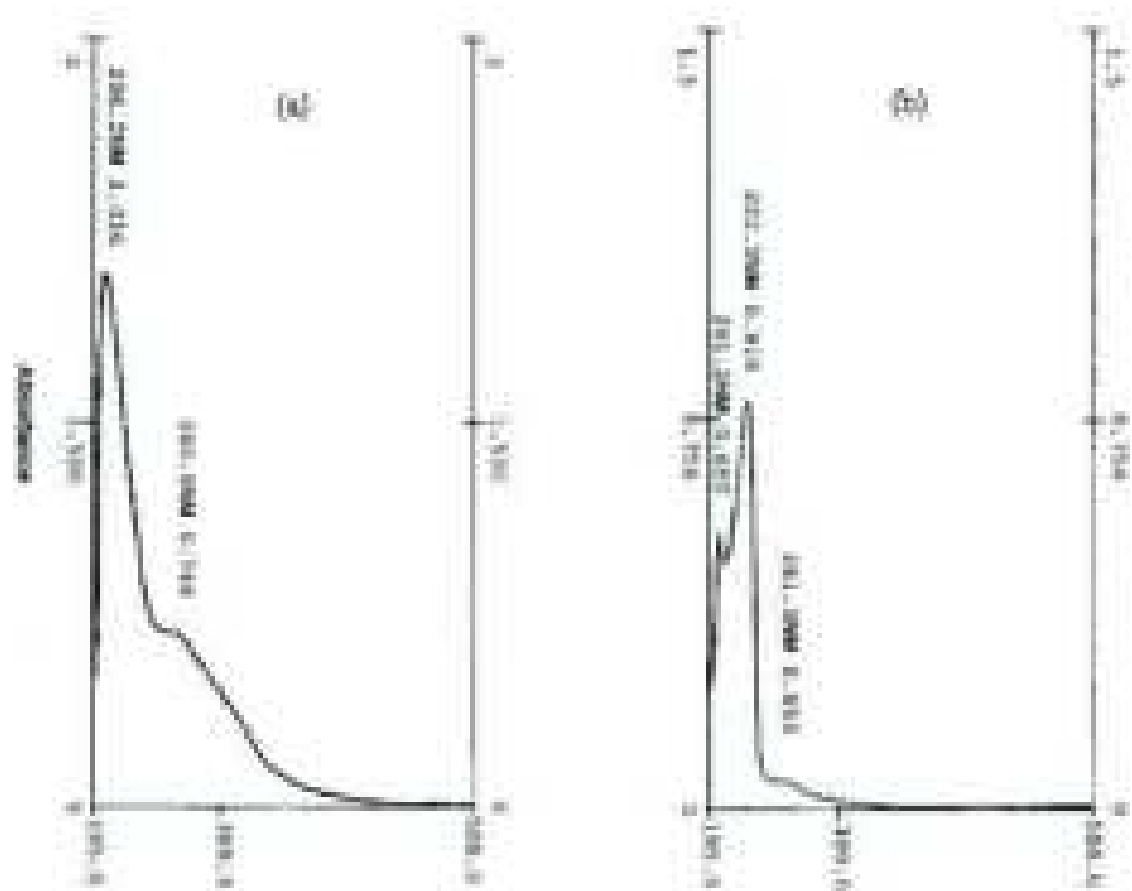
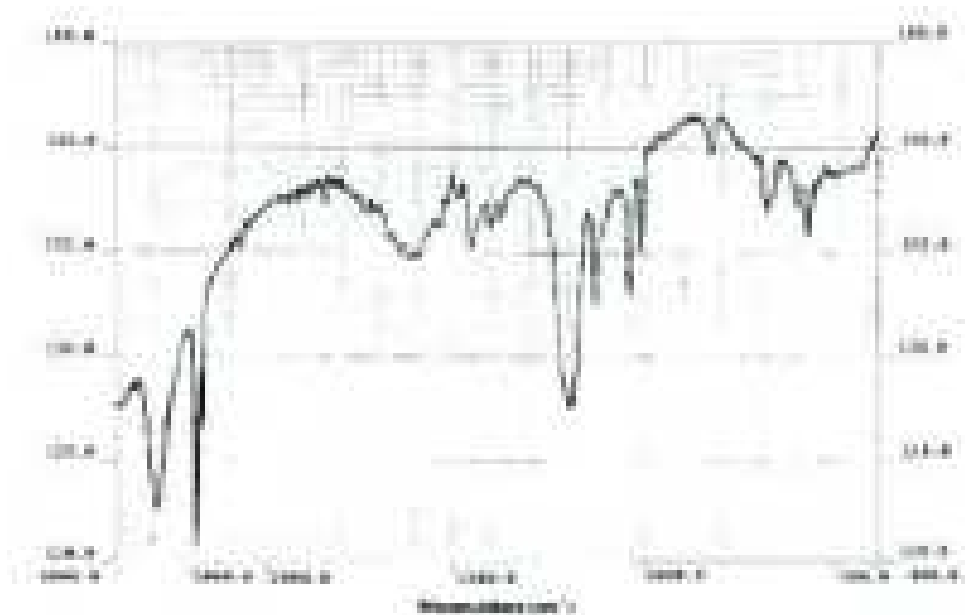


Figure 62. Profil d'élution en HPLC de la première injection du produit semi-pur Sg10B solubilisé dans du méthanol.

Colonne C18 semi-préparative, Delta pack (300Å, 7,8 × 300 mm, 15µ), gradient discontinu de méthanol-eau, débit 2 ml/min, détection en UV à 220 nm.



**Figure 63.** Spectres d'absorption dans l'UV-visible de l'extrait butanolique brut (a) et de l'antibiotique Sg10B (b) dissout dans le méthanol.



**Figure 64.** Spectre d'absorption dans l'infrarouge du produit Sg10B.



### 3.4. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse de l'antibiotique Sg10B (figure 65) montre un pic moléculaire à  $m/z$  326,8 représentant la molécule déprotonée [M-H]. Ainsi, le poids moléculaire de l'antibiotique Sg10B est de 328.



**Figure 65.** Spectre de masse de l'antibiotique Sg10B (electrospray ionisation, mode négatif).

## 4. Discussion

Les données relatives aux révélations chimiques et au spectre infrarouge suggèrent que l'antibiotique antifongique principal Sg10B contient au moins deux cycles benzéniques (révélation positive au formaldéhyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$  et bandes caractéristiques à l'infrarouge) avec un ou plusieurs sucres (naphtorésorcinol positif), des groupements méthyles et probablement des liaisons étherées. D'après la classification de Berdy *et al.*, (1987), l'antibiotique Sg10B appartient à la famille n° 8 (antibiotiques aromatiques), la sous-famille n° 4 (autres dérivés aromatiques) et au groupe n° 2 (aromatiques glycosylés).

Il est à signaler que l'antibiotique Sg10B ressemble fortement à l'antibiotique C1 de l'isolat Sg163. Ils ont le même comportement en CCM (même  $R_f$ ), les mêmes réactions chromogéniques, les mêmes profils des spectres UV-VIS et IR, la même masse et la même activité. Ils représenteraient très probablement une même molécule.

Parmi les antibiotiques sécrétés par les souches de *Streptosporangium*, la sibiromycine, l'acide figaroïque, et les sinéfungines sont des aromatiques glycosylés. La sibiromycine, sécrétée par *S. sibiricum* (Hurley *et al.*, 1979a,b) diffère de nos antibiotiques par son activité qui est seulement antibactérienne, son poids moléculaire ( $M = 475$ ), et ses spectres UV-visible ( $\lambda_{\text{max}}$  230 et 310 nm) et infrarouge. L'acide figaroïque produit par *Streptosporangium* sp. (Bradner *et al.*, 1978) a une masse de 513 et une activité uniquement antibactérienne. Les sinéfungines sont des antibiotiques de nature peptidyl-nucléoside (Cooper *et al.*, 1990) produites par *Streptosporangium* sp. ayant seulement une activité antifongique et des poids moléculaires entre 363 et 422.

De plus, *Streptosporangium carneum* l'espèce la moins différente de l'isolat Sg10, produit un complexe d'antibiotiques de nature lipoglycopeptide (Michel et Yao, 1994), à activité dirigée contre les bactéries à Gram positif, un maximum d'absorption UV à 282 nm et des poids moléculaires élevés (entre 1676 et 1718).

De nombreux antibiotiques appartenant au groupe des aromatiques glycosylés sont décrits dans la littérature (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Umezawa, 1988; Takizawa *et al.*, 1995; Buckingham, 1997; "Dictionary of Natural Products", 2004; "Heterocycles", 2004). Les actinomycètes, particulièrement les souches du genre *Streptomyces*, sécrètent des antibiotiques à la fois antifongiques et antibactériens. Leur comparaison avec nos molécules montre qu'ils sont différents par leurs couleurs et/ou les spectres UV-visible et infrarouge.

Des études telles que la spectroscopie RMN du proton et du carbone 13 sont nécessaires pour déterminer la structure de la molécule Sg10B. Les travaux sur les 3 autres antibiotiques de la souche Sg10 devraient être également réalisés pour aboutir à leur structures chimiques.

---

# DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Ce travail rentre dans le cadre d'un axe de recherche qui vise à isoler des actinomycètes rares d'origine saharienne et étudier les antibiotiques produits, potentiellement intéressants dans les domaines agro-alimentaire, vétérinaire et médical. Il vient compléter ceux réalisés par notre équipe de recherche. Pour notre part, nous nous sommes intéressés au genre *Streptosporangium*. Les objectifs visés sont l'isolement sélectif des *Streptosporangiaceae* puis la sélection et l'étude approfondie de trois isolats de *Streptosporangium* présentant des activités antibiotiques intéressantes .

La recherche et l'isolement de nouveaux antibiotiques naturels à partir d'un microorganisme non étudié précédemment est une voie longue et difficile car aucune connaissance a priori sur l'isolat et son métabolisme n'est disponible. Plusieurs essais d'expérimentations sont donc souvent indispensables pour trouver les conditions optimales de production et de purification. De plus, le résultat final n'est jamais garanti, car il pourrait aboutir après des années de travail, à une molécule déjà connue.

La première partie du travail a permis l'isolement des souches du genre *Streptosporangium* à partir de divers sols sahariens d'Algérie (palmeraies, regs, alluvions, gisements, etc.). Ainsi, l'analyse de 30 échantillons de sols a permis d'isoler 31 souches présentant les caractéristiques morphologiques des *Streptosporangium*. Plusieurs travaux indiquent que les membres du genre *Streptosporangium* sont détectés dans différents sols mais en faibles proportions par rapport à la population actinomycétale (Hayakawa *et al.*, 1988; Lee et Hwang, 2002). Pour faciliter leur isolement, différentes méthodes d'isolement sélectif sont développées (Nonomura et Ohara, 1969a; Hayakawa *et al.*, 1991a,b; Terekhova *et al.*, 1991; Hayakawa *et al.*, 1997; Kizuka *et al.*, 1997). Dans notre cas, les souches de *Streptosporangium* sont détectées dans les échantillons de sol prélevés dans les palmeraies uniquement (palmeraies d'Adrar, de Béni-Abbès, de Tolga et de Touggourt). Elles n'ont pas été mises en évidence dans les sols provenant du Hoggar (jardins, alluvions et gisements), de M'Sila (plaines arides) et de Gassi-Touil (regs du Sud de Ouargla). Parmi les 31 isolats, sept sont obtenus sans utilisation d'agents sélectifs, mais certains antibiotiques comme la pénicilline, la cyclosérine et la kanamycine, se sont montrés sélectifs pour les *Streptosporangium*. Le pré-traitement des sols à la chaleur, préconisé par Nonomura et Ohara (1969a) pour la sélection des genres rares a nettement facilité l'isolement des *Streptosporangium* en éliminant un grand nombre de bactéries gênantes.

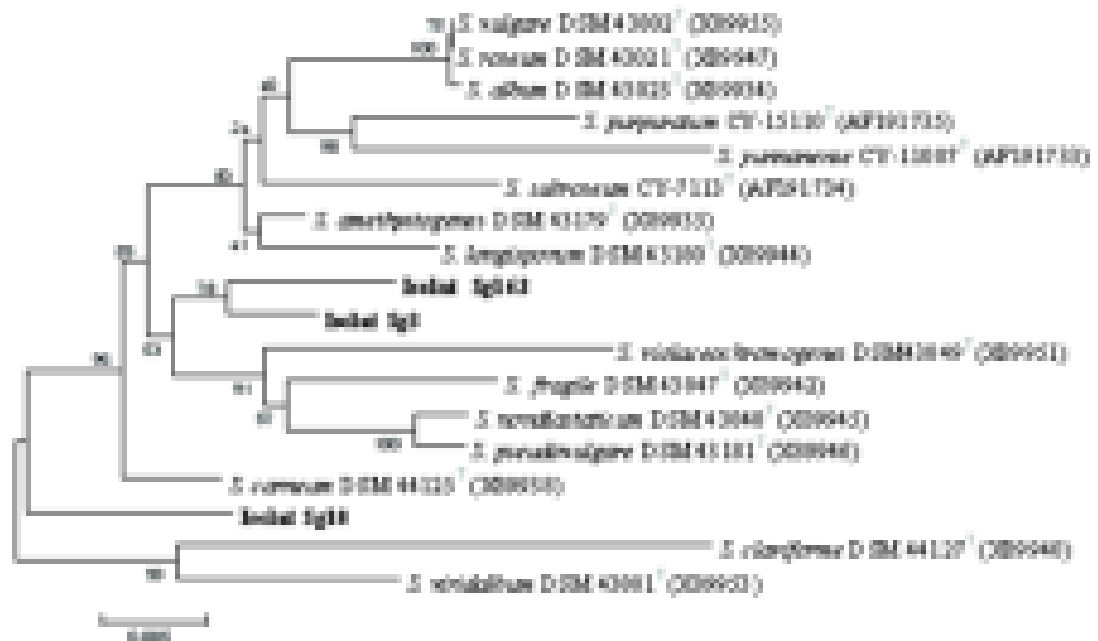
Sur la base d'une étude macro et micromorphologique, les 31 isolats de *Streptosporangium* ont été classés dans six groupes morphologiques comprenant chacun des isolats semblables morphologiquement et représentant probablement un même taxon. Les 31 isolats ont également fait l'objet d'une étude de leurs activités antimicrobiennes par la méthode des stries croisées. Chacun des isolats est actif contre au moins un microorganisme-test. Ils présentent tous une activité antibactérienne (contre la bactérie à Gram positif, *Micrococcus luteus*) et possèdent également, selon les isolats, une activité contre les champignons, les levures ou les bactéries à Gram négatif. Les *Streptosporangium* sont connus pour produire des antibiotiques de différentes familles

chimiques (anthracyclines, angucyclines, nucléosides, macrolides) et ayant différentes activités biologiques: antibactériennes, antifongiques, antilevuriennes, antitumorales, insecticides, herbicides, inhibiteurs d'enzymes, promoteurs de croissance, etc. (Platas *et al.*, 1999).

Après ces études préliminaires sur la taxonomie et les propriétés antimicrobiennes, trois isolats ayant présenté une morphologie différente des espèces valides de *Streptosporangium* et une activité antibiotique intéressante, ont été sélectionnés pour une étude approfondie de leur taxonomie et de leurs antibiotiques. Il s'agit des isolats Sg3, Sg163 et Sg10. L'identification de ces trois isolats a été effectuée par des études morphologique, chimique, physiologique et moléculaire.

Actuellement, la détermination de nouvelles espèces de microorganismes s'effectue non seulement par des méthodes phénotypiques (études morphologique et physiologique) mais aussi par des critères chimiques (chimiotaxonomie) et des critères moléculaires qui se sont avérés être essentiels (Harvey *et al.*, 2001). Le genre *Streptosporangium* comprend actuellement 15 espèces valides (DSMZ, 2005). Les tests phénotypiques sont aussi indispensables pour la description d'une nouvelle espèce (Euzéby, 2002) surtout si potentiellement, elle représente une source de nouveaux composés bioactifs (Goodfellow, 1991).

Ainsi, nos trois isolats ont fait l'objet d'une étude morphologique, chimique, physiologique et moléculaire. Les séquences de l'ADNr 16S des trois isolats ont été déterminées et comparées avec celles des autres espèces de référence du genre *Streptosporangium*, disponibles dans la banque de données GenBank. Les résultats obtenus ont clairement confirmé ceux des études morphologique et physiologique et ont montré que chacune d'elles représente une nouvelle espèce du genre *Streptosporangium*. Les pourcentages de similarité varient entre 96,3 et 98,8 avec les espèces valides de *Streptosporangium*. Chacun de nos trois isolats représenterait très probablement une nouvelle espèce. Ceci est appuyé par le fait que les deux espèces de *Streptosporangium*, *S. roseum* et *S. vulgare* sont différentes entre elles, mais présentent presque 100% de similarité. De plus, les analyses phylogénétiques indiquent clairement que chacun des trois isolats se distingue l'un de l'autre et des autres espèces de *Streptosporangium* (figure 66). L'hybridation ADN-ADN entre nos isolats et les espèces les moins différentes du point de vue phylogénétique permettra de confirmer leur originalité.



**Figure 66.** Dendrogramme phylogénique montrant la position des isolats Sg3, Sg163 et Sg10 par rapport aux espèces-types de *Streptosporangium*. La barre indique 0,005 substitutions par position de nucléotide.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons étudié la production, la purification et la caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par chacun des trois isolats. La production des antibiotiques a été réalisée dans un milieu de culture complexe (ISP2) sélectionné. La purification a été effectuée par chromatographie sur couches minces et sur colonne de gel de Séphadex et par HPLC. Les principales molécules bioactives ont été caractérisées par des méthodes physico-chimiques et spectroscopiques (UV-Visible, Infrarouge, spectrométrie de masse, RMN du proton et du carbone 13).

L'étude de la production d'antibiotiques en fonction des milieux de culture montre pour les trois isolats, que le milieu ISP2 contenant du glucose comme source de carbone est favorable à la production d'antibiotiques. Ces résultats confirment ceux de Platas *et al.* (1999) qui étudièrent les préférences nutritionnelles de 12 souches de *Streptosporangium* et rapportèrent que parmi 35 sources carbonées testées, le glucose est utilisé préférentiellement. Le milieu ISP2 a donc été sélectionné comme milieu de production.

Pour déterminer une structure chimique, quelques milligrammes de la molécule pure sont nécessaires. Ces quantités sont obtenues difficilement, particulièrement, lorsque les isolats (tels que les nôtres) sécrètent un grand nombre d'antibiotiques ou des complexes de molécules (proches entre elles ou associées aux sels ou encore hydrophiles). Les étapes de purification deviennent longues et difficiles. Ces difficultés sont de plus en plus réduites avec l'apparition des nouvelles techniques de séparation et de détermination des structures telles que le couplage HPLC/spectrométrie de masse, HPLC/IR et HPLC/RMN (Hook, 1997). Ces appareils modernes sont plus sensibles, informatisés et équipés de banques de données permettant de caractériser une molécule dans un extrait brut naturel (molécule non encore pure) et de la comparer aux autres molécules disponibles dans les banques de données (Eldridge, 2002). Ceci fournit rapidement des informations sur la molécule.

Chacune des 3 souches sécrète entre 4 et 24 antibiotiques, en majorité des complexes d'antibiotiques très proches entre eux, à activités antifongiques et antibactériennes, et appartenant à différentes familles, notamment celles des angucyclinones (des antibiotiques aromatiques proches des anthracyclines), des aminosides et des aromatiques glycosylés. Ces molécules, de par leurs caractéristiques physico-chimiques et spectroscopiques, se distinguent nettement de celles décrites dans la littérature.

La première souche intéressante retenue pour une étude détaillée de ses antibiotiques est *Streptosporangium* sp. Sg3. Elle sécrète des antibiotiques à activité antibactérienne, antifongique et antilevurienne. Nous nous sommes intéressés aux antibiotiques rouges de la phase organique que nous avons purifiés et caractérisés. Cette fraction rouge contient 8 molécules à activités antibactérienne (anti-Gram positif) principalement, et également antifongique et antilevurienne. Les 8 molécules sont proches entre elles. La structure chimique du principal antibiotique R2.2, a été déterminée. Il s'agit d'une angucyclinone, une famille d'antibiotiques proches des anthracyclines, connus pour leurs puissantes activités antitumorales et antimicrobiennes. Les autres molécules ne diffèrent du R2.2 que par la présence ou l'absence d'un groupement méthyle. Parmi les espèces de *Streptosporangium*, seule *S. roseum*<sup>n° 79089</sup> produit 3 antibiotiques (WS79089A, B et C) de type angucycline (Tsurumi *et al.*, 1994). Plus de 150 molécules d'angucyclinones naturelles sont connues (Bycroft, 1988; "Dictionary of Natural Products", 2004; "Heterocycles", 2004; "American Chemical Society", 2006). L'antibiotique majeur R2.2 est une nouvelle molécule. Elle est différente des autres angucyclinones par la présence d'un 5<sup>ème</sup> cycle collé au noyau de base tétracyclique et portant un groupement éthyle (en position C10) ainsi que par le nombre et les positions des groupements hydroxyles. Les structures chimiques des sept autres molécules rouges sont à déterminer par les analyses de RMN du <sup>13</sup>C de manière à confirmer leur appartenance à une même famille. Les études sur les antibiotiques rouges, R1 et R3 ainsi que les antibiotiques jaunes et ceux de la phase aqueuse méritent d'être poursuivies.

L'isolat Sg163 sécrète au moins 24 antibiotiques appartenant à deux groupes. Les antibiotiques du premier groupe, correspondant au complexe 163A et comprenant 10 molécules, sont des aminoglycosides. Ils sont présents dans la phase aqueuse (non extrait par les solvants organiques), et possèdent une puissante activité contre les levures dont *Candida albicans*, pathogène pour l'homme. Ces antibiotiques sont très solubles dans l'eau et le diméthylsulfoxyde et insolubles dans les solvants organiques. Leur purification en quantités suffisantes n'a pas été possible en raison de leur liaison extrêmement forte avec des sels lesquels n'ont pu être éliminés après passage en colonne de gel de silice, de Séphadex G25-80 ou de Séphadex LH-20, ce qui a rendu ainsi la purification par HPLC très difficile. En effet, de nombreuses injections et ré-injections pendant plusieurs jours n'ont permis de purifier qu'une quantité minime de chacun des antibiotiques, tout juste suffisante pour les analyses spectroscopiques de l'UV-visible, l'infrarouge et la masse. Les aminosides n'ont jamais été signalés chez le genre *Streptosporangium*. De par leurs activités exclusivement antilevurienne, les antibiotiques de 163A sont originaux, car la majorité des aminoglycosides sont antibactériens. Des études supplémentaires telles que la spectroscopie de la RMN du proton et du carbone 13 sont nécessaires pour déterminer leurs structures chimiques.

Les antibiotiques du second groupe sont des aromatiques glycosylés. Ils correspondent aux complexes d'antibiotiques 163B et 163C (présents dans la phase organique, extraits par le *n*-butanol) composés de 14 molécules. Ils possèdent une activité antifongique forte particulièrement contre les champignons phytopathogènes et toxigènes et également

une activité antibactérienne. La comparaison préliminaire de ces antibiotiques avec ceux décrits dans la littérature, basée sur les données spectroscopiques et leur activité ne nous a pas permis de les déterminer. Ces aromatiques se distinguent également de ceux élaborés par ce genre. Cependant, des études expérimentales (spectres de masse, résonance magnétique nucléaire, analyse élémentaire...) doivent être poursuivies pour déterminer leurs structures chimiques et tirer ainsi les conclusions définitives.

L'isolat Sg10 produit 4 antibiotiques à activités antibactériennes uniquement ou antifongiques et antibactériennes à la fois. La caractérisation partielle de l'antibiotique principal Sg10B révèle que c'est un aromatique glycosylé présentant une activité antifongique et antibactérienne. Des études telles que la spectroscopie RMN du proton et du carbone 13 sont nécessaires pour déterminer la structure de la molécule Sg10B. Les travaux sur les 3 autres antibiotiques de la souche Sg10 devraient être également réalisés pour aboutir à leur structures chimiques.

L'ensemble des résultats obtenus pour les trois isolats donne un aperçu général sur le potentiel des souches du genre *Streptosporangium* à produire des antibiotiques de différentes familles et avec une variété d'activités biologiques. Nos résultats sont prometteurs et les perspectives qui en découlent sont nombreuses. Ils encouragent la poursuite des études selon trois grandes lignes, l'une relative à l'isolement sélectif des souches, la seconde à la taxonomie et la troisième aux antibiotiques et ce, sur plusieurs aspects :

- La recherche continue de nouvelles souches du genre *Streptosporangium*, en améliorant les méthodes de sélection et en diversifiant les sols et les écosystèmes sahariens. En effet, l'utilisation de différents traitements chimiques (agents germicides) et physiques (chaleur sèche, radiations) des échantillons de sol permet d'éliminer les bactéries non mycéliennes indésirables et favoriser la croissance des *Streptosporangium*. Par ailleurs, les résultats de l'étude physiologique de nos isolats fournissent des informations sur leurs préférences nutritionnelles et contribuent au développement des milieux d'isolement spécifiques. De plus, la résistance des isolats de *Streptosporangium* à certains antibiotiques permet également de choisir ces derniers comme agents sélectifs à incorporer dans le milieu de culture. Les recherches dans ce domaine sont en cours dans notre laboratoire et les premiers résultats sont très intéressants et montrent l'intérêt à poursuivre le travail dans ce sens.

- La réalisation de l'hybridation ADN-ADN entre nos isolats et les espèces de référence phylogénétiquement les moins différentes de *Streptosporangium*, pour confirmer l'originalité de nos souches. En effet, les isolats Sg3, Sg163 et Sg10 se distinguent des espèces connues de *Streptosporangium*. Leurs caractéristiques culturelles, physiologiques et surtout phylogénétiques (séquençage de l'ADNr 16S) laissent entrevoir la possibilité de trois nouvelles espèces qu'il faudra confirmer par l'hybridation ADN-ADN.

- L'optimisation de la production des antibiotiques en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources carbonées et azotées, éléments minéraux, aération, pH, etc.).

- Il serait aussi intéressant de développer des méthodes adéquates de purification pour les antibiotiques de la phase aqueuse, particulièrement ceux du complexe 163A de l'isolat Sg163, doués d'une puissante activité antilevurienne.

- La détermination, après obtention de quantités pures suffisantes, des structures chimiques des antibiotiques sécrétés à activités intéressantes, en particulier les antifongiques qui se sont avérés de nature non polyénique.

- La réalisation des tests complémentaires (antitumoral, antiviraux, inhibition d'enzymes, etc.) afin de déterminer le spectre d'action de chacun des antibiotiques.
- La réalisation des tests de génotoxicité vis-à-vis des cellules animales, avant de prétendre une application possible pour nos antibiotiques.