

***Nouvelles espèces de Saccharothrix
isolées des sols sahariens et nouveaux
antibiotiques secrétés par Saccharothrix
SP. SA198***

Par BOUBETRA–BISKRI Dalila

M. SABAOU Nasserline Professeur à l'ENS de Kouba, Alger Rapporteur
Soutenue le 17/06/2013

devant le jury composé de : M. BELLAL Mouloud Mohand Professeur à l'ENSA, Alger Président
BAKOUR Rabah Professeur à l'USTHB, Alger Examineur ZITOUNI Abdelghani Professeur à l'ENS
de Kouba, Alger Examineur Mme LOUANCHI Mériem Maître de Conférences A à l'ENSA, Alger
Examineur

Table des matières

Avant-Propos . .	5
Dédicace . .	7
RESUME . .	8
ABSTRACT . .	10
ص-مخلملا . .	11
Liste des abréviations . .	12
INTRODUCTION GENERALE . .	14
PARTIE I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE . .	17
I.- TAXONOMIE DES ACTINOMYCETES ET DU GENRE <i>SACCHAROTHRIX</i> . .	17
1.- Définition de l'Ordre des <i>Actinomycetales</i> . .	17
2.- Taxonomie des actinomycètes . .	17
3.- Taxonomie du genre <i>Saccharothrix</i> . .	25
II.- DONNEES SUR L'ECOLOGIE DES ACTINOMYCETES ET DU GENRE <i>SACCHAROTHRIX</i> . .	26
III.-IMPORTANCE DES ACTINOMYCETES ET DU GENRE <i>SACCHAROTHRIX</i> . .	27
1.- Importance dans le domaine pharmaceutique, médical et vétérinaire . .	27
2.- Importance dans le domaine agronomique . .	29
3.- Importance dans d'autres domaines . .	31
IV.- LES ANTIBIOTIQUES . .	31
1.- Définition . .	31
2.- Classification générale des antibiotiques . .	31
3.- Antibiotiques naturels antibactériens . .	32
4.- Antibiotiques naturels antifongiques . .	33
5.- Microorganismes producteurs . .	35
6.- Mode d'action des antibiotiques . .	36
7.- Résistance des microorganismes aux antibiotiques . .	37
8.- Production, purification et détermination des structures des antibiotiques . .	38
9.- Recherche de nouvelles molécules actives . .	42
PARTIE II MATERIEL ET METHODES . .	45
I.- ISOLATS D'ACTINOMYCETES . .	45
1.- Origine des isolats . .	45
2.- Purification et conservation des isolats . .	45
II.- ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES . .	45
1.- Etude morphologique . .	45
2.- Etude chimique des constituants cellulaires . .	46
3.- Etude physiologique . .	50
4.- Etude moléculaire . .	51
III.- PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DE <i>SACCHAROTHRIX</i> SUR <i>MILIEUX SOLIDES</i> . .	55
1.- Microorganismes-cibles . .	55

2.- Tests d'antagonisme par la méthode des stries croisées . .	55
IV.- ETUDE DES ANTIBIOTIQUES SECRETES PAR SACCHAROTHRIXSA198 . .	56
1.- Cinétiques de production des antibiotiques en milieu liquide . .	56
2.- Extraction et mise en évidence des antibiotiques . .	57
3.- Antibiographie . .	57
4.- Mise en évidence des antibiotiques par bioautographie . .	58
5.- Etude de la stabilité des antibiotiques . .	59
6.- Purification des antibiotiques . .	60
7.- Etudes physico-chimiques et spectroscopiques des antibiotiques . .	61
8.- Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) . .	62
PARTIE III RESULTATS ET DISCUSSION . .	63
I.- ETUDE TAXONOMIQUE DES ACTINOMYCETES . .	63
1.- Détermination du genre . .	63
2.-Détermination des espèces . .	68
3.- Conclusion . .	77
II.- PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DE SACCHAROTHRIX SUR MILIEUX SOLIDES . .	78
1.- Résultats . .	78
2.- Discussion . .	79
III.- ETUDE DES ANTIBIOTIQUES SECRETES PAR SACCHAROTHRIX SP. SA198 . .	81
1.- Cinétiques de production des antibiotiques en milieux liquides . .	81
2.- Extraction et mise en évidence des antibiotiques . .	85
3.- Etude de la stabilité de l'activité antibiotique . .	90
4.- Purification des antibiotiques . .	92
5.- Etudes physico-chimiques et spectroscopiques des antibiotiques . .	98
6.- Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques . .	111
CONCLUSION GENERALE . .	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . .	118
ANNEXES . .	137
ANNEXE I MILIEUX DE CULTURE . .	137
ANNEXE 2 RÉVÉLATEURS CHIMIQUES (Merck, 1975) . .	140

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) (ex Laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, au laboratoire de Génie Chimique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (INPT- ENSAT) et au laboratoire DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) en Allemagne.

- Le bon déroulement de ce travail n'aurait pu se faire sans l'aide de nombreuses personnes tant au laboratoire que dans mon entourage, je les en remercie chaleureusement.
- Tout d'abord, je tiens à remercier monsieur le Professeur Nasseridine SABAOU, de m'avoir donné l'opportunité de rejoindre son équipe, de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce travail et pour la qualité de son encadrement. Je le remercie également pour sa disponibilité et pour son degré d'implication dans ces travaux. Qu'il accepte le témoignage de ma profonde reconnaissance.

J'exprime également mes remerciements à Monsieur A. LEBRIHI et Madame F. MATHIEU, Professeurs à l'INPT-ENSAT de Toulouse, pour leur accueil au sein de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

J'adresse mes remerciements également à Monsieur H.P. **KLENK, Professeur** à DSMZ en Allemagne, pour la réalisation de certaines expériences, notamment les hybridations ADN-ADN.

J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur M.M. BELLAL, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach, Alger, qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur R. BAKOUR, Professeur à la faculté des Sciences Biologiques (USTHB), qui a bien voulu examiner ce travail.

Je remercie vivement madame M. LOUANCHI, Maître de conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach, Alger, qui a bien voulu faire partie de mon jury.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à Monsieur A. ZITOUNI, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, pour son aide précieuse. Je le remercie d'avoir bien voulu me donner une nouvelle preuve en acceptant de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Mademoiselle A. MEKLAT et Monsieur N. BOURAS, pour leur contribution à la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur C. BIJANI, du Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC), CNRS de Toulouse, pour la réalisation des spectres RMN et leur interprétation.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements et amitiés à tous les membres du laboratoire LBSM de l'ENS de Kouba, en particulier H. BOUDJELLA, F. BOUDJELAL, R. MERROUCHE, L. LAMARI, O. TOUMATIA, A. YEKKOUR, S. BELGHIT, E. DRICHE, B. BADJI, A. RIBA, S. MOKRANE, N. KHEBIZI et L. BAKOUR.

Mes remerciements vont également à mes collègues de l'USTHB, qui n'ont jamais hésité à me remplacer durant mon absence pendant les périodes de stages: M. AMGOUD, T. AIT KETTOUT,

B. BOUCENNA, S. BOUDJEMLINE, K. BOULAHIA K, H. SADJI, D. TOUAM, S. TRABCI
et S. OSMANE.

Je tiens à remercier Monsieur N. HAFFERSSAS pour son aide et ses encouragements.

Dédicace

Je remercie Dieu le Généreux pour m'avoir donné le courage et de m'avoir aidé à surmonter tous les obstacles pour mener ce travail à terme. Je dédie affectueusement cette thèse : A mes très chers parents avec toute mon affection, mon respect et ma Profonde reconnaissance. A mon mari et mes enfants Nadji et Aya. Je vous dois beaucoup. Que ce travail soit pour vous un témoignage de ma reconnaissance pour ces années de compréhension. A mes sœurs et mes frères. A mes beaux parents. A mes beaux-frères et mes belles-sœurs. A mes neveux et nièces A la famille REDJAME, SLIMANI et CHILI.

RESUME

Trois isolats d'actinomycètes, SA152, SA181 et SA198, provenant de sols sahariens d'Algérie, ont été étudiés du point de vue de la taxonomie et des propriétés antagonistes.

Les études morphologiques et chimiques ont permis de rattacher les trois isolats au genre *Saccharothrix*. Une étude moléculaire portant sur le séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S a permis de confirmer l'appartenance de ces isolats au genre déjà défini. Le test d'hybridation ADN-ADN réalisé pour deux de ces isolats, SA181 (avec les espèces les plus proches *S. longispora*, *S. xinjiangensis* et *S. texasensis*) et SA152 (avec les espèces les plus proches *S. xinjiangensis* et *S. texasensis*) a montré des taux de similarité bien inférieurs à 70%, confirmant ainsi l'appartenance de ces deux isolats à de nouvelles espèces de *Saccharothrix*, lesquelles ont été nommées *Saccharothrix hoggarensis* et *S. saharensis*. Les souches ont été déposées dans deux collections mondiales, la DSMZ sous les numéros DSM 45457^T et DSM 45456^T, et la CCUG sous les numéros 60214^T et 60213^T respectivement.

Les trois souches de *Saccharothrix* se sont montrées actives contre les de microorganismes cibles choisis (bactéries, levures et champignons filamenteux), témoignant ainsi d'un spectre d'action assez large.

La production d'antibiotiques par *Saccharothrix* sp. SA198, ayant montré une meilleure activité que les deux autres souches sur milieu solide, est évaluée sur deux milieux de culture liquide (ISP2 et Bennett), en utilisant *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramannianus* comme microorganismes-cibles. Les résultats obtenus ont montré que cet isolat produit des activités antifongiques et antibactériennes. Cette production est meilleure sur milieu ISP2.

La fraction active A, sécrétée par *Saccharothrix* sp. SA198, et révélée par bioautographie, a été semi-purifiée par chromatographie sur couche épaisse de gel de silice. La purification finale a été poursuivie par HPLC (colonne C18) pour trois composés majoritaires et les plus actifs: A4, A5 et A5.1. La caractérisation de ces trois composés par des méthodes physico-chimiques et spectroscopiques (UV-visible, infrarouge, spectrométrie de masse, RMN du proton et du carbone 13) a montré que les trois molécules A4, A5 et A5.1 sont identifiées respectivement au:

4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-méthyl-hepta-2,4-dienylidène)-3,6-dioxo-cyclohexylidène]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène-2-acide carboxylique.

4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-méthyl-octa-2,4-dienylidène)-3,6-dioxo-cyclohexylidène]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène-2-acide carboxylique.

4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-7-méthyl-hepta-2,4-dienylidène)-3,6-dioxo-cyclohexylidène]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène-2-acide carboxylique.

Ces antibiotiques sont très proches entre eux. Les composés A5 et A5.1 sont des isomères de position et possèdent un CH₂ en plus par rapport à A4.

Une comparaison de la structure de ces antibiotiques à celle des molécules qui sont déjà décrites dans la littérature, a montré qu'aucune molécule bioactive connue ne ressemble aux trois antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198, ce qui a permis de les considérer comme étant de nouveaux antibiotiques.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des trois composés a montré qu'ils possèdent une activité globalement assez intéressante et qui est particulièrement forte contre certains champignons toxigènes ou pathogènes pour l'homme.

ABSTRACT

Three isolates of actinomycetes SA152, SA181 and SA198, from Algerian Saharan soil, were studied in terms of taxonomy and antagonistic properties. Morphological and chemical studies allowed to attach the tree isolates to *Saccharothrix* genus. A molecular study based on the sequencing of DNA encoding 16S rRNA confirmed the assignment of isolates to the genus already defined. The test of DNA-DNA hybridization performed for two of these isolates, SA181 (with the most closely related species *S. longispora*, *S. xinjiangensis* et *S. texasensis*) and SA152 (with the most closely related species *S. xinjiangensis* et *S. texasensis*) showed similarity rate well below 70%, thus confirming the presence of two new species of *Saccharothrix* genus, which were named *Saccharothrix hoggarensis* and *S. saharensis*. The strains were deposited in two world collections, the DSMZ under DSM 45457^T and DSM 45456^T numbers, and CCUG under 60213^T and 60214^T numbers respectively.

The three strains of *Saccharothrix* have been active against the microorganisms target selected (bacteria, yeasts and filamentous fungi), reflecting a broad spectrum of action.

Antibiotic production by *Saccharothrix* sp. SA198, which showed better activity than the other two strains on solid media, is evaluated on two liquid culture media (ISP2 and Bennett), using *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* and *Mucor ramannianus* as target microorganisms. The results showed that this isolate produces antifungal and antibacterial activities. This production is better on ISP2 medium.

The active fraction A, secreted by *Saccharothrix* sp. SA198, and revealed by bioautography was semi-purified by chromatography on silica gel plates. Final purification was continued by HPLC (C18 column) for three major and active compounds: A4, A5 and A5.1. The characterization of these three compounds by physico-chemical and spectroscopic methods (UV-visible, infrared, mass spectrometry, proton NMR and carbon-13) showed that these three molecules A4, A5 and A5.1 are identified respectively to:

4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-methyl-hepta-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-carboxylic acid.

4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-methyl-octa-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-carboxylic acid.

4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-7-methyl-hepta-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-carboxylic acid.

These antibiotics are very close to each other. A5 and A5.1 compounds are positional isomers and have a CH₂ more, compared to A4.

A comparison of the structure of these antibiotics to the molecules that are already described in the literature showed that no known bioactive molecule resembles to the three antibiotics secreted by *Saccharothrix* sp. SA198, which has regarded as new antibiotics.

The determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of the three compounds showed that they possess an interesting activity and is particularly strong against phytopathogenic and toxinogenic fungi.

ص-خلجلا

تناولت هذه الدراسة ثلاثة بكتريا هيبة SA181 و SA198 و SA152SA198. تم عزلها من أثرية صحراوية جزائرية لغرض إنجاز دراسة تصنيفية وكشف عن إنتاجها للمضادات الحيوية. بفضل الأبحاث المورفولوجية والكيميائية التي أجريت على هذه العزلات الثلاثة، تم تصنيفها ضمن الجنس *Saccharothrix*. والدراسة الجزيئية المقطعة المورثية 16S المشفرة للمضاد القوي الريبي الريوزومي أكدت إنشاء هذه العزلات للجنس *Saccharothrix*. أما التهجين الجزيئي من النوع ADN/ADN الذي تم إنجازه للزئتين SA152 و SA181 (مع الأنواع المتقاربة وراثيا *S.texasensis* و *S.ninjiangensis*), و SA152 (مع الأنواع المتقاربة وراثيا *S.texasensis* و *S.ninjiangensis*). أظهرت نسبة تشابه أقل بكثير من 70% وهذا تم إثبات بأن العزلات تنتمي إلى أنواع جديدة من جنس *Saccharothrix* والتي سميت *Saccharothrix saharensis* و *Saccharothrix hoggarensis* وتم وضعهما في مجموعتين علميتين DSMZ تحت الرقمين 60213[†] و 60214[†] علوالموالي. و قد تبين أن العزلات الثلاثة تنتج جزيئات ذات نشاط مضاد للجراثيم المستهدفة التي تم اختيارها من المكتبرية الخمائر والفطريات.

الإنتاج للمضادات الحيوية من طرف *Saccharothrix* sp.SA198 و التي بينت أحسن نشاط مضاد على الأوساط الغذائية الصلبة من العزلات الأخرى، تم الكشف عنه في أوساط غذائية سائلة (ISP2 و Bennett) باستعمال *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius*, *Mucor ramaniannus* كجراثيم مستهدفة. بينت النتائج أن هذه العزلة تنتج جزيئات ذات نشاط مضاد للفطريات والبكتيريا وأن هذا الإنتاج يكون أفضل في الوسط الغذائي ISP2. الجزيئية A ذات النشاط المضاد للجراثيم، المفردة من قبل *Saccharothrix* sp.SA198 و التي تم تحديدها بطرق الكشف الحيوي (bioautographie) تمت تنقيتها بواسطة الكروماتوغرافيا على رقائق السلس.

تواصلت التنقية لثلاثة مضادات حيوية A4,A5,A5.1 (التي أصبحت أكثر نشاطا) بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الدقة (HPLC) تم خضعت الجزيئات الثلاثة النقية لدراسات طبيعية تضمنت الأشعة فوق البنفسجية والمرئية والأشعة تحت الحمراء، طيف الكتلة والرقن المغناطيسي القوي الكريون 13 و البروتون. من خلال هذه التحاليل تم التعرف على الجزيئات الثلاثة وهي كالتالي:

4-Hydroxy-4-(9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-methyl-hepta-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl)-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-acide carboxylique.

4-Hydroxy-4-(9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-methyl-octa-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl)-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-acide carboxylique.

4-Hydroxy-4-(9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-7-methyl-hepta-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl)-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-acide carboxylique.

هذه المضادات الحيوية متشابهة فيما بينها وتشبه نفس المجموعة الكيميائية. وأثبتت مقارنة للصبغة الكيميائية لهذه المضادات الحيوية مع الصبغات المشروقة، بأنه لا يوجد أي تشابه مع المضادات التي نقرها SA198 *Saccharothrix* sp. وهذا ما يسمح لنا بأن نستخرج مضادات حيوية جديدة. نتائج المحددة لتركيزات الحد الأدنى السميطة (CMI)، أظهرت بأن هذه الجزيئات تكتسب نشاط فعال ضد الفطريات المضررة بالبقلات والإنسان.

Liste des abréviations

- ADN Acide désoxyribonucléique
- A E Acétate d'éthyle
- AM Acétate d'éthyle – méthanol
- Ara Arabinose
- ARDRA Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
- ARN Acide ribonucléique
- B.A.E. *n*-butanol-acide acétique-eau
- BETBromure d'éthydiium
- BLAST Basic Local Alignment Search Tool
- BUT. *n*-butanol
- CCM Chromatographie sur couche mince
- CCUG [Culture Collection, University of Göteborg, Suède](#)
- CD3OD Méthanol deutérié
- CMI Concentration minimale inhibitrice
- COSY Correlation Spectroscopy
- CPG Chromatographie en phase gazeuse
- DAP Diaminopimelic acid
- DM Dichlorométhane
- dNTP Désoxyribonucléotide triphosphate
- DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
- E.A.E. Ethanol – ammoniacque – eau
- E. coli *Escherichia coli*
- EMC Extrait méthanolique des cellules
- FAB Fast Atom Bombardment
- FS Front du solvant
- Gal Galactose
- Gly Glycine
- G+C Guanine + Cytosine
- GYEA Glucose-Yeast Extract-Agar (milieu de culture)
- HE *n*-hexane
- HMBC Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity
- HPLC High Performance Liquid Chromatography
- HSQC Heteronuclear single quantum coherence
- ISP International *Streptomyces* Project (milieu de culture)
- IC Ionisation chimique
- IR Infrarouge
- KBR Bromure de potassium

- LBSM Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens
- LC-MS Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
- Lys Lysine
- MeOH Méthanol
- MA Mycélium aérien
- MS Mycélium du substrat
- Mr Mucor
- NA Non actif
- NRRL Northern Regional Research Center, USA.
- Orn Ornithine
- OYG Oatmeal-Yeast extract-Glycerol (milieu de culture)
- PC Phosphatidylcholine
- PCR Polymerase Chain Reaction
- PE Phosphatidyléthanolamine
- PS Pigment soluble
- PLA Polylactide
- PG Phosphatidylglucosamine
- q.s.p. Quantité suffisante pour
- RMN Résonance Magnétique Nucléaire
- TAE Tris-Acétate – EDTA (tampon)
- TSA Tryptic Soya Agar
- UDP Uridine Diphosphate
- UV-VIS Ultraviolet – Visible
- V Volume
- Xyl Xylose

INTRODUCTION GENERALE

Les sols désertiques, soumis à un climat aride, furent longtemps considérés comme abiotiques en raison du régime thermo-hydrique très défavorable au développement des microorganismes, avant d'être considérés par la suite peu riches en espèces et abritant celles ayant élaboré des stratégies particulières pour s'adapter à ces conditions environnementales extrêmes. Cette propriété d'adaptation aux conditions externes, en particulier au stress climatique, traduit la vitalité de cette biodiversité particulière qui constitue un réservoir de matériel génétique unique.

Les travaux de Sabaou (1980) ont montré que dans le sol de deux palmeraies du sud-ouest algérien (Béni Abbès et Adrar); la microflore tellurique était en majorité représentée par des actinomycètes (75 à 90%). Dès lors, les actinomycètes des sols sahariens ont attiré l'attention sur plus d'un plan, taxonomique et écologique (Sabaou, 1988; Sabaou *et al.*, 1992), lutte biologique (Amir et Sabaou, 1983; Sabaou et Bounaga, 1987; Amir et Amir, 1989) et recherche de nouvelles molécules bioactives Hacène *et al.* (1993 et 1994).

Les actinomycètes, sont des bactéries à Gram positif aérobies ayant un pourcentage en guanine plus cytosine (G + C) supérieur à 55% et dont la majorité tend à former un véritable mycélium ramifié. Bien qu'ils constituent un groupe diversifié, les actinomycètes partagent de nombreuses propriétés.

Par leur structure procaryote, la dimension cellulaire et la sensibilité aux substances antibactériennes et aux bactériophages, ces microorganismes se rapprochent beaucoup des autres groupes bactériens. Cependant, certains caractères tels que leur macromorphologie, leur structure mycélienne et leur mode de reproduction, les rapprochent également des champignons.

De nombreuses espèces ont acquis une grande importance pratique en produisant des enzymes, des vitamines, des composés antitumoraux, des vasodilatateurs, des inhibiteurs d'enzymes, des hormones, des analgésiques, des activateurs immunitaires, des immunosuppresseurs, des hypoglycémifiants, des substances anticholestérolémiques, etc. (Solecka *et al.*, 2012).

Cependant, l'intérêt majeur que suscite les actinomycètes est surtout en relation avec leur pouvoir à produire des antibiotiques. En effet, l'arsenal des composés antimicrobiens dérive essentiellement des produits naturels sécrétés par les actinomycètes et les champignons (Butler et Buss, 2006; Newman et Cragg, 2007), et plus de 90% des antibiotiques utilisés en pratique sont issus de ce groupe de microorganismes (Hamaki *et al.*, 2005). Ainsi, depuis plus de 50 ans, l'antibiothérapie est le moyen de défense majeure contre les infections microbiennes, et parmi les fermentations industrielles, la production d'antibiotiques est l'un des secteurs les plus importants.

Actuellement, avec l'apparition des maladies d'origine microbienne qui touchent l'homme, le nombre croissant de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques (kumarasamy *et al.*, 2010) et les insuffisances encore perceptibles de la thérapeutique fongique, plusieurs de ces antibiotiques sont devenus peu ou non efficaces (Demain, 2000). De ce fait, plusieurs stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces. Parmi les microorganismes,

les actinomycètes continuent d'être le groupe le plus exploité dans ce sens, en particulier, pour ces dernières années, les souches appartenant à des genres rares ou pas très fréquents (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 disposent 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 et plusieurs nouvelles molécules ont été mises en évidence chez des genres rares ou peu fréquents tels que *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora* et *Streptosporangium* (Genilloud *et al.*, 2011).

Par ailleurs, les méthodes sélectives utilisées pour mettre en évidence les actinomycètes rares (qui ne sont pas isolés par les méthodes conventionnelles) ont permis de sélectionner plusieurs d'entre eux (Boudjella, 1994 et 2007; Hayakawa *et al.*, 1995; Sabaou *et al.*, 1998). Certains sont producteurs de nouveaux antibiotiques d'une importance médicale (Lazzarini *et al.*, 2001).

Les sols sahariens d'Algérie ont montré une grande diversité en genres d'actinomycètes, des plus fréquents comme *Streptomyces* (Sabaou *et al.*, 1992) aux moins fréquents ou au plus rares tels que *Actinomadura*, *Nocardioides*, *Nocardiosis*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *catellatospora*, *Oerskovia*, *Saccharomonospora*, *Thermomonospora*, etc. (Boudjella, 1994; Zitouni, 1995; Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2004a et 2005). Des actinomycètes halophiles ou halotolérants appartenant aux genres *Actinopolyspora*, *Actinoalloteichus*, *Nocardiosis*, *Saccharomonospora*, *Streptomonospora* et *Saccharopolyspora* (Boudjelal *et al.*, 2011; Meklat *et al.*, 2011).

Plusieurs de ces souches sont des espèces nouvelles et la plupart produisent de nouvelles molécules antimicrobiennes (Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004b,c et 2005; Badji *et al.*, 2005, 2006, et 2007 Boudjella *et al.*, 2007 et 2011; Meklat *et al.*, 2012).

Le genre *Saccharothrix* fait partie des actinomycètes rares très peu étudié. Actuellement, ce genre compte 12 espèces décrites, et certaines souches sécrètent plusieurs antibiotiques de nature chimique assez diversifiée et à spectre d'action intéressant.

Les travaux menés sur *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (Zitouni *et al.*, 2004a), isolée dans notre laboratoire (Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens, LBSM), à partir d'un sol de la palmeraie d'Adrar, ont permis de constater que cette souche est productrice de plusieurs molécules nouvelles de la classe des dithiopyrrolones et présente des activités antibactériennes et antifongiques intéressantes (Lamari *et al.*, 2002a,b; Merrouche *et al.*, 2010 et 2011). *Saccharothrix* sp. SA 103, qui a été isolée d'un sol du Hoggar et qui semble être une nouvelle espèce d'actinomycète, produit des mutactimycines (Zitouni *et al.*, 2004a,b), des macrolides (Zitouni, 2005) et des antibiotiques nucléosidiques (Zitouni *et al.*, 2005) dont certains sont originaux.

Ainsi, ces résultats très encourageants nous ont poussé à entreprendre des investigations sur ce genre, qui est considéré comme étant rare ou peu fréquent.

A cet égard, nous nous sommes intéressés à trois souches d'actinomycètes isolées des sols sahariens d'Algérie et identifiées au genre *Saccharothrix*. Ces trois isolats ont été étudiés du point de vue taxonomique et de la production d'antibiotiques.

Ce manuscrit se propose, après une présentation bibliographique sur les actinomycètes et leurs antibiotiques, de faire trait à une deuxième partie où le matériel et les méthodes utilisés sont présentés et à une troisième partie consacrée aux résultats obtenus et à leurs discussions.

Dans cette dernière partie, sont d'abord présentés les résultats de l'étude taxonomique de trois isolats de *Saccharothrix*, SA152, SA181 et SA198 (études morphologique, chimique, physiologique et moléculaire), suivi d'une évaluation du pouvoir antagoniste exprimé par ces trois isolats, puis de l'étude des antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198: production et purification des antibiotiques, identification de leurs structures chimiques par des méthodes spectroscopiques et spectrométriques, et évaluation de leurs activités biologiques.

PARTIE I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.- TAXONOMIE DES ACTINOMYCETES ET DU GENRE SACCHAROTHRIX

1.- Définition de l'Ordre des *Actinomycetales*

Les actinomycètes sont classés dans le Règne des *Procaryotes*, la Division des *Firmicutes*, la Classe des *Thallobacteria* et l'Ordre des *Actinomycetales*. Cet Ordre est défini dans le Manuel de Systématique de Bergey de 1994 comme regroupant des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en guanine plus cytosine (G + C) supérieur à 55%. Il comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant du cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharothrix*) et ceux qui possèdent un mycélium bien différencié et persistant (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*) (figure 1). Ce vaste groupe compte actuellement plus de 140 genres (Solecka *et al.*, 2012).

2.- Taxonomie des actinomycètes

Nous nous intéresserons surtout aux actinomycètes formant un véritable mycélium.

Les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires sont les outils utilisés dans la taxonomie des actinomycètes pour définir les différents genres et espèces. En effet, la taxonomie a progressé en fonction du développement des connaissances. Elle s'est au début fondée sur des critères essentiellement morphologiques et physiologiques. Par la suite, Lechevalier et Lechevalier (1970a) proposèrent un système de classification des genres (ou groupes) d'actinomycètes basé sur des caractères morphologiques et chimiques. Ce principe a été d'une grande utilité, permettant de clarifier la taxonomie des actinomycètes au niveau générique. Les critères chimiques utilisés dans la classification de ces microorganismes touchent surtout à la composition de leur paroi cellulaire en acides aminés et en sucres, et leur membrane plasmique en lipides. Vint ensuite la taxonomie numérique qui a combiné l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques. L'obtention de dendrogrammes montrant les similitudes physiologiques a permis de déterminer avec plus de précision les espèces de *Nocardia* (Orchard et Goodfellow, 1980), *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1983), *Actinomadura* (Athalye *et al.*, 1985), *Nocardiopsis* (Grund et Kroppenstedt, 1990) et *Actinophanes* (Goodfellow *et al.*, 1990). La taxonomie numérique a même permis de créer un genre, en l'occurrence, *Rhodococcus* (Goodfellow et Alderson, 1977). Enfin, l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S et l'hybridation ADN-ADN, ont permis respectivement de tracer toute la phylogénie des actinomycètes et de déterminer avec précision les espèces (Stackebrandt et Kroppenstedt, 1987; Kinoshita *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2004).

2.1.- 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 certains genres ou groupes. Les critères morphologiques sont énoncés, entre autres, dans les Manuels de Bergey 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.*, 1986).
- 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, et 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 de structures spéciales telles que les synnemata (*Actinosynnema*), les sclérotés, les faux sporanges (*Kibdelosporangium*), etc.

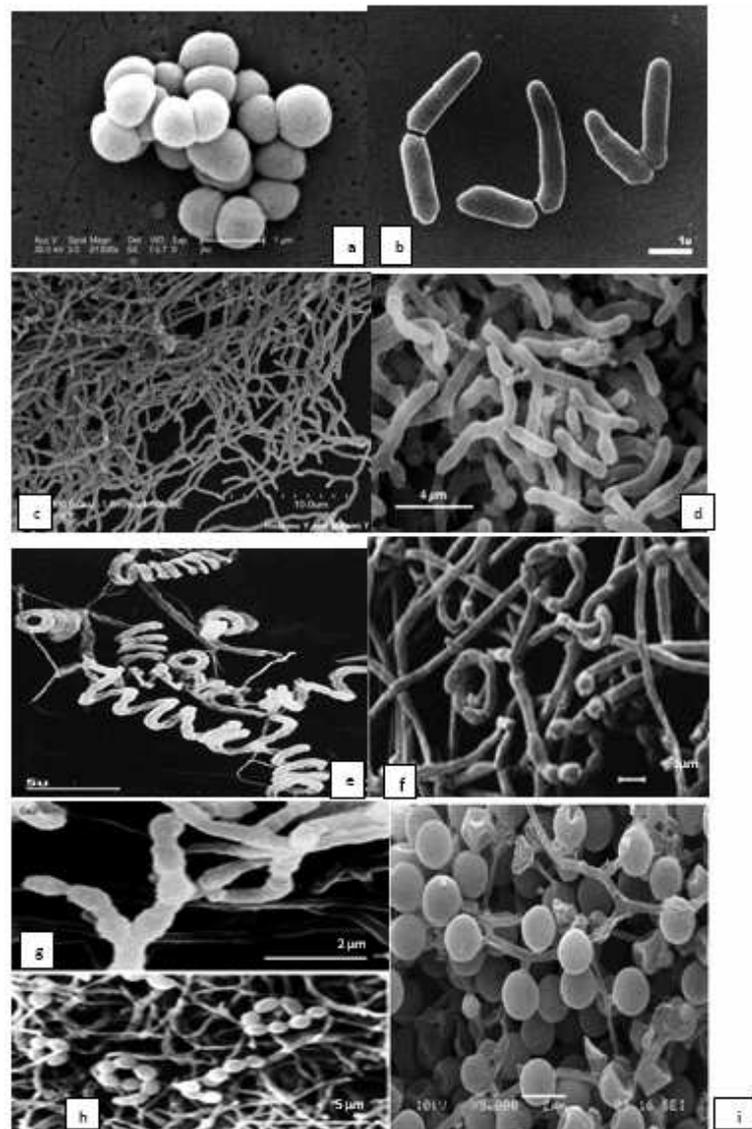


Figure 1. Micromorphologie de quelques espèces d'actinomycètes: a, *Micrococcus luteus*; b, *Arthrobacter globiformis*; c, *Nocardia transvalensis*; d, *Rhodococcus* sp.; e, *Streptomyces avermitilis*; f, *Streptomyces ferralitis*; g et h, *Actinomadura bangladeshensis*; i, *Microbiospora thailandensis* (source: web graphie; voir à la fin de la liste des références bibliographiques, page 144).

2.2.- 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*, *Nocardiopsis*, *Microtetrastora*, *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 tels que les phospholipides, les ménaquinones et les acides gras (Jones et Krieg, 1989).

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.

2.2.1.- Composition pariétale en acides aminés

En plus de la N-acétylglucosamine, de l'acide N-acétyl muramique, de l'acide D-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 (DAP). Chez les actinomycètes, le DAP 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 DAP 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 (tableau 1).

2.2.2.- 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, 1970a). La composition en sucres permet de déterminer ainsi les chimiotypes A, B, C, D et E. Les actinomycètes ne possédant pas de sucres taxonomiquement importants sont classés dans le chimiotype C (tableau 1).

2.2.3.- Classification des actinomycètes en chimiotypes

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

Les différents chimiotypes retrouvés chez les actinomycètes sont regroupés dans le tableau 1. Ainsi, en se basant sur la forme LL ou DL de l'acide diaminopimélique (DAP), la présence ou non de glycine, de lysine, d'ornithine ou d'acide diaminobutyrique (DAB), Becker *et al.* (1965) ont définis dix chimiotypes (I, II, III, ..., VIII). A ces chiffres sont corrélés des lettres (A, B, C, D et E), définis par Lechevalier et Lechevalier (1970a,b) en se basant sur les sucres taxonomiquement importants: l'arabinose, le galactose, le xylose, le madurose et le rhamnose.

Les chimiotypes pariétaux ont permis de distinguer, par exemple, entre les genres *Nocardia*, *Streptomyces*, *Actinomadura* et *Nocardiopsis*, ces genres présentant des caractères morphologiques assez proches (Williams et Wellington, 1981).

2.2.4.- Compositions membranaire et pariétale en lipides

La composition membranaire et pariétale en lipides est un critère chimique essentiel dans la reconnaissance des genres. En effet, des genres différents peuvent avoir le même chimiotype.

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

2.2.4.1.- Les phospholipides membranaires

La composition des membranes plasmiques en phospholipides est un critère très important complétant les chimiotypes définis précédemment. L'analyse de ces composés a permis de distinguer plusieurs genres entre eux et ayant la même morphologie et le même type pariétal, tels que *Pseudonocardia* et *Amycolatopsis* (Lechevalier *et al.*, 1986), *Nocardiosis* et *Saccharothrix* (Labeda *et al.*, 1984), etc. 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 (tableau 2).

2.2.4.2.- Les acides gras membranaires

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

Chimio type	DAP		Gly	Lys	Orn	DAB	Asp	Sucres				Genres représentatifs
	LL	DL						Ara+Gal	Xyl+Ara	Rha+Gal	Mad	
I C	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardioïdes</i> , <i>Sporichthya</i> , etc.
II D	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>Actinoplanes</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Glycomyces</i> , etc.
III B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Streptosporangium</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Actinomadura</i> , etc.
III C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Nocardiosis</i> , <i>Thermomonospora</i> , etc.
III E	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Saccharothrix</i> , <i>Kutzneria</i> , <i>Actinosyne</i>
IV A	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Pseudonocardia</i> .
V	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Actinomyces</i> .
VI	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>Oerskovia</i> , <i>Premicromonospora</i> .
VII	-	-	+	V	-	+	-	-	-	-	-	<i>Agronomyces</i> , <i>Clavibacter</i> .
VIII	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>Aureobacterium</i> , <i>Curvobacterium</i> .

Note: +, présent; -, absent; V, variable suivant les espèces d'un même genre. Aspartate (Asp), Glycine (Gly), Lysine (Lys), Ornithine (Orn), Acide diaminobutyrique (DAB), Acide diaminopimélique (DAP), Arabinose (Ara), Galactose (Gal), Madurose (Mad), Rhamnose (Rha), Xylose (Xyl).

Tableau 1 . Chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes.

chimiques lorsque le cas s'impose. Leurs types et leurs pourcentages sont caractéristiques de plusieurs genres (Grund et Kroppenstedt, 1990; Kroppenstedt *et al.*, 1990).

Tableau 2. Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes.

Types de phospholipides	PE	PC	PG	PGL	Genres représentatifs
PI	-	-	-	v	<i>Actinomadura</i> , <i>Spirillospora</i> , <i>Nocardioides</i> , etc.
PII	+	-	-	-	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>kutzneria</i> , <i>Saccharothrix</i> , etc.
PIII	-	+	-	v	<i>Nocardiopsis</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , etc.
PIV	+	-	+	-	<i>Streptosporangium</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i> , etc.
PV	-	-	+	+	<i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Cellulomonas</i> , etc.

Note: Tous les actinomycètes possèdent le phosphatidyl inositol, v = présence variable.

Phosphatidyl-éthanolamine (PE), phosphatidyl-choline (PC), phospholipides avec glucosamine (PG), phosphatidyl-glycérol (PGL).

2.2.4.3.- Les ménaquinones membranaires

Les ménaquinones sont des lipides membranaires ayant dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carbonée aliphatique composée d'unités isoprènes. Elles sont classées suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (Collins *et al.*, 1980; Minnikin *et al.*, 1984). Exemple, la ménaquinone MK-9(H2) a neuf unités isoprènes dont deux sont hydrogénées. Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides.

2.2.4.4.- Les acides mycoliques pariétaux

Les acides mycoliques sont des lipides pariétaux complexes et insaturés. Il 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.

2.3.- Critères physiologiques et taxonomie numérique

Les critères physiologiques sont utilisés (avec les critères moléculaires) pour la détermination des espèces. Les tests physiologiques (en nombre élevé) ont été utilisés dans le cadre d'une taxonomie numérique (Athalye *et al.*, 1985). Ces critères consistent en un certains nombres de tests qui permettent d'évaluer la capacité des actinomycètes à dégrader 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 certaines conditions (température, pH, salinité, etc).

La taxonomie numérique est une méthode de classification qui a commencé à prendre de l'ampleur au début des années 1970 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 des coefficients de Sokal et Michener,

de Jaccard, 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 moléculaires telles que la phylogénie basée sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, et l'hybridation ADN-ADN (Labeda, 1988; Goodfellow *et al.*, 1990; Grund et Kroppenstedt, 1990).

2.4.- Critères moléculaires

Les analyses moléculaires sont utilisées dans la taxonomie des actinomycètes pour la détermination des espèces. L'introduction des 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).

Les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie sont l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), l'hybridation ADN-ADN, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine, et à un degré moindre, l'analyse des séquences des protéines ribosomiques.

2.4.1.- Analyse des séquences du gènecodant pour l'ARN ribosomique 16S

L'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN 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).

L'ADN génomique codant pour l'ARN ribosomique 16S (d'une taille de l'ordre de 1500 paires de bases) est un gène chromosomique présent chez toutes les espèces. Ce gène est amplifié 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. Ces séquences nucléotidiques sont traitées par des programmes informatisés gratuits sur le Web (Philip, Clustal W, etc.). Stackebrandt *et al.* (1981b et 1983) sont les premiers à avoir utilisé ces techniques pour la taxonomie des actinomycètes.

Pour les études phylogénétiques, 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 phylogéniques (ex.: le "Bootstrap") (Felsenstein, 1985). Les algorithmes disponibles transforment les profils obtenus en dendrogrammes de similitudes. À présent, la base de données la plus complète est celle de l'ADN codant pour l'ARNr 16S concernant presque la totalité des genres décrits.

L'adhésion d'une nouvelle souche à la classe des *Actinobacteria* est indiquée par des valeurs de similitude des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 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 aussi être différentes (surtout entre 97 et 99%).

2.4.2.- 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 déterminer si la souche analysée représente une nouvelle espèce ou non. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de réassociation de leurs brins d'ADN inférieur à 70% (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt et Goebel, 1994).

2.4.3.- 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).

2.4.4.- 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*, *Nocardiosis*, *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).

3.- Taxonomie du genre *Saccharothrix*

3.1.- Position taxonomique du genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* a été créé par Labeda *et al.* (1984) avec comme espèce-type *S. australiensis*. Cette espèce fut classée dans un premier temps dans la famille des *Pseudonocardiaceae* (Embley *et al.*, 1988), puis beaucoup plus tard, dans celle des *Actinosynnemataceae* et ce, sur la base des parentés phylogénétiques (Labeda et Kroppenstedt, 2000).

Morphologiquement, le genre *Saccharothrix* est caractérisé par la présence d'un mycélium aérien (MA) abondant ou très peu produit selon les espèces et les souches, de longues chaînes de spores ovoïdes ou en bâtonnets (1 à 2 µm x 0,7 à 1 µm) non mobiles issues de la fragmentation anarchique des filaments du MA et une fragmentation (excessive ou rare) du mycélium du substrat en éléments coccoïdes (Labeda et Kroppenstedt, 2000).

Chimiquement, il est caractérisé par une paroi cellulaire de type III E (Labeda, 1987; Labeda et Kroppenstedt, 2000; Labeda *et al.*, 2001), c'est-à-dire, présence de l'isomère DL (*méso*) de l'acide diaminopimélique et absence de glycine, et présence de sucres caractéristiques qui sont le rhamnose et le galactose. Les acides mycoliques pariétaux sont absents. Les phospholipides membranaires sont, selon la classification de Lechevalier *et al.* (1977), du type PII (présence de phosphatidyléthanolamine = PE) ou du type PIV (PE + phospholipides contenant de la glucosamine). Les ménaquinones prédominants sont de type MK-9(H4) ou MK-10(H4).

3.2.- Espèces du genre *Saccharothrix*

Quelques années après la création de ce genre, plusieurs espèces de *Saccharothrix* furent découvertes (Labeda et Lechevalier, 1989; Labeda et Lyons, 1989). Quelques isolats appartenant au genre *Nocardiopsis* et à d'autres genres, furent reclassés parmi les *Saccharothrix* (Grund et Kroppenstedt, 1990), mais ce genre a connu également plusieurs remaniements. En effet, plusieurs isolats de *Saccharothrix* ont été transférés vers d'autres genres, tels que *Lentzea* (Yassin *et al.*, 1995), *Crossiella* (Labeda, 2001), *Lechevalieria* (Labeda *et al.*, 2001), *Goodfellowia* (Labeda et Kroppenstedt, 2006) et *Umezawaea* (Labeda et Kroppenstedt, 2007).

Les deux dernières espèces de *Saccharothrix* ont été découvertes en 2011. Il s'agit de *S. variisporea* (Kim *et al.*, 2011) et *S. yanglingensis* (Yan *et al.*, 2011).

Actuellement, le genre *Saccharothrix* compte 12 espèces décrites, dont deux sous-espèces (tableau 3)

Tableau 3. Liste des espèces de *Saccharothrix*.

Espèces	N° d'accès	Références
<i>S. accharothrix australiensis</i>	ATCC 31497	Labeda, 1984
<i>S. texasensis</i>	ATCC 51593	Labeda et Lyons, 1989
<i>S. espanaensis</i>	ATCC 51144	Labeda et Lechevalier, 1989
<i>S. mutabilis</i> subsp. <i>mutabilis</i>	ATCC 31520	Labeda et Lechevalier, 1989
<i>S. mutabilis</i> subsp. <i>capreolus</i>	ATCC 23892	Grund et Kroppenstedt, 1990
<i>S. coeruleofusca</i>	ATCC 35108	Grund et Kroppenstedt, 1990
<i>S. longispora</i>	AT CC 35109	Grund et Kroppenstedt, 1990
<i>S. syringae</i>	ATCC 51364	Grund et Kroppenstedt, 1990
<i>S. algeriensis</i>	NRRL B-24137	Zitouni <i>et al.</i> , 2004
<i>S. xinjiangensis</i>	AS 4.1731	Hu <i>et al.</i> , 2004
<i>S. violaceirubra</i>	NBRC 102064	Otoguro <i>et al.</i> , 2009
<i>S. variisporea</i>	NRRL B-16296	Kim <i>et al.</i> , 2011
<i>S. yanglingensis</i>	CGMCC 4.5627	Yan <i>et al.</i> , 2011

II.- DONNEES SUR L'ECOLOGIE DES ACTINOMYCETES ET DU GENRE SACCHAROTHRIX

Les actinomycètes sont retrouvés presque partout dans la nature. Outre les sols cultivés, ils sont présents dans des sols polaires gelés en permanence, tout comme dans des sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4000 m de profondeur (Cross, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Par contre, ils semblent être absents des eaux minières très acides (pH < 1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (Lechevalier, 1981).

Les actinomycètes sont en majorité saprophytes, mais quelques formes sont pathogènes pour l'homme (*Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides*), les plantes (*Streptomyces scabies*) ou les animaux (*Actinomyces bovis*) (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). 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 d'Algérie, 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*, *Thermomonospora*, etc. (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2005). Des actinomycètes halophiles ou halotolérants ont également été isolés. Il s'agit des genres *Actinopolyspora*, *Actinoalloteichus*, *Nocardioïpsis*,

Saccharomonospora, *Streptomonospora* et *Saccharopolyspora* (Boudjelal *et al.*, 2011; Meklat *et al.*, 2011). De nouvelles espèces appartenant aux genres *Saccharothrix* (*S. algeriensis*) et *Actinopolyspora* (*A. algeriensis*, *A. saharensis* et *A. mzabensis*) ont été décrites respectivement par Zitouni *et al.* (2004a) et Meklat (2012) et plusieurs autres nouvelles espèces sont en cours de description.

Plusieurs de ces isolats d'origine saharienne sont producteurs d'antibiotiques et sont à l'origine de nouvelles molécules bioactives (Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004b,c, 2005; Badji *et al.*, 2006, 2007; Boudjella *et al.*, 2010; Merrouche *et al.*, 2010, 2011).

Les *Saccharothrix* sont isolés en très petits nombres à partir de divers substrats et écosystèmes. On les retrouve dans les sols, les gisements de minéraux, les eaux usées, les eaux et les sédiments des océans, les sols sahariens, les sols salés et alcalins, etc. Leur pourcentage par rapport au total des actinomycètes oscille entre 0 et 0,5% dans le monde (Athalye *et al.*, 1985). Mais dans certains échantillons de sols sahariens, ce pourcentage peut atteindre entre 8 et 15% du total des actinomycètes (Sabaou *et al.*, 1998).

Il n'y a aucune méthode décrite pour la sélection du genre *Saccharothrix* (Meyer, 1989) et les seuls résultats positifs sont obtenus par combinaison de plusieurs facteurs. Le milieu « chitine-vitamines agar » reste l'un des milieux les plus utilisés pour isoler ce genre. Lors d'une étude sélective, Boudjella (1994) a constaté que l'utilisation de certains antibiotiques tels que la pénicilline, la polymyxine et la streptomycine, à certaines concentrations dans le milieu de culture, permettent parfois d'augmenter le nombre d'isolats de ce genre par rapport aux autres actinomycètes. Le lysozyme, à 0,005% (w/v), permet également la sélection partielle de ce genre (Zitouni, travaux non publiés).

III.-IMPORTANCE DES ACTINOMYCETES ET DU GENRE *SACCHAROTHRIX*

Les actinomycètes sont des procaryotes producteurs de différents métabolites secondaires très intéressants. La diversité métabolique des actinomycètes est due à leur génome extrêmement important, possédant des centaines de facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes, leur permettant ainsi de répondre aux besoins spécifiques (Goshi *et al.*, 2006).

1.- Importance dans le domaine pharmaceutique, médical et vétérinaire

1.1.- Importance des actinomycètes en général

Actuellement, une bonne partie de l'arsenal des composés antimicrobiens dérive des produits naturels sécrétés par les actinomycètes. En effet, parmi les 22 000 produits microbiens bioactifs, 10 100 sont sécrétés par les actinomycètes (Solecka *et al.*, 2012). Ces microorganismes sont les plus prolifiques de tous les micro-organismes en tant que producteurs d'antibiotiques.

C'est Waksman qui fut le premier à démontrer la richesse des actinomycètes dans ce domaine. C'est aussi dans ses laboratoires que furent isolés les quatre premiers

antibiotiques utiles: l'actinomycine (en 1940), premier composé antitumoral isolé (mais trop toxique), la streptomycine (en 1944), antibactérien et premier antituberculeux, la néomycine (en 1949), antibactérien et la candidine (en 1953), antifongique ayant aussi des propriétés pharmacologiques intéressantes en tant que ligand des stéroïdes.

Parmi les espèces d'actinomycètes, celles appartenant au genre *Streptomyces* sont les plus importantes productrices d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires. On peut estimer que 75% (7600) des métabolites bioactifs isolés des actinomycètes sont produits par des streptomycètes (Lam *et al.*, 2007).

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des actinomycètes. Certaines sont utilisées à cet effet dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) 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).

Les actinomycètes sont également des producteurs potentiels de nombreux composés intéressants en industrie pharmaceutique et alimentaire, tels que les vitamines, les inhibiteurs, les immunomodulateurs, etc. (Nolan et Cross, 1988; Peszinska-czoch et Mordarski, 1988; Sanglier *et al.*, 1993; Bertasso *et al.*, 2003), les composés antitumoraux et cytostatiques (carcinostatine, adriamycine, anthramycine, daunomycine, rebeccamycine, etc.), les antimétabolites (ansamitocine, etc.), les antihistaminiques, les analgésiques, les vasodilatateurs, les immunostimulants et les immunosuppresseurs (Tsuboya *et al.*, 1996; Demain, 1999; Zhou *et al.*, 2006).

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, nikkomycine, etc.), les mitocides (tétranactine), les antihelminthes (avermectines) et les piscicides (antimycine A) (Stapley, 1982; Demain, 1999).

Les antibiotiques ont trouvé aussi 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 pour accroître les rendements zootechniques, comme c'est le cas de la spiramycine et de la terramycine ou chlortétracycline (Schwarz *et al.*, 2001).

1.2.- Importance du genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* sécrète plusieurs antibiotiques de nature chimique assez diversifiée (tableau 4). Parmi les premiers antibiotiques décrits, nous citerons la nocamycine, sécrétée par une souche de *S. syringae* (Brazhnikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979). Certains antibiotiques sont doués d'une activité antibactérienne (Gram positif et plus rarement Gram négatif), comme les galacardines, ou antifongique comme le thiazolopyridine, ou encore antibactérienne et antifongique à la fois, comme les dithiopyrrolones, la dopsisamine et la formamycine. D'autres composés sécrétés présentent des activités antitumorales (ex.: ammocidine, pluraflavines), antivirales (fluvirucines), herbicides (phosphonothrixine et coformycine qui sont des nucléosides carbocycliques), ou inhibitrices de métalloprotéases ou d'autres enzymes (molécule WS75624).

Le tableau 4 donne les principales substances bioactives synthétisées par les différentes souches et espèces du genre *Saccharothrix*, ainsi que les références correspondantes.

2.- Importance dans le domaine agronomique

2.1.- Importance des actinomycètes en général

Les actinomycètes jouent un rôle très important dans les phénomènes de biodégradation et de transformation de la matière organique. Ils peuvent dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries non mycéliennes, 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 toxigènes (mycotoxines) et réduire ainsi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (Holzapfel *et al.*, 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; Toumatia, 2010).

Le genre *Frankia* vit en association avec de nombreux arbres tels 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).

Plusieurs souches et espèces d'actinomycètes appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Microbispora*, etc., ont été décrites comme endophytes et ayant un effet PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Solans *et al.*, 2009) et certaines sécrètent des phytohormones comme l'acide 3-indol-acétique (AIA) et la gibbérelline (Khamna *et al.*, 2009; Solans *et al.*, 2011).

Composés	Propriétés	Origines	Références
Nocarycine	antitumorale	<i>S. syringae</i>	Braznikova <i>et al.</i> , 1977 Horvath <i>et al.</i> , 1979
Polymyxine	antibiotique*	<i>S. mutabilis</i>	Jain <i>et al.</i> , 1962
Dopsisamine	antibiotique	<i>S. mutabilis</i>	Takahashi <i>et al.</i> , 1986
LL-C19004	antibiotique	<i>S. espanaensis</i>	Kirby <i>et al.</i> , 1987
Kinamycines	antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Isshiki <i>et al.</i> , 1989
Ménaquinones	antiparasitaire	<i>Saccharothrix</i> sp.	Perry <i>et al.</i> , 1990
Sékothricide	antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Kim <i>et al.</i> , 1991; Seto <i>et al.</i> , 1992
Tétrazomine	antibiotique	<i>S. mutabilis</i>	Sato <i>et al.</i> , 1991
Galacardines	antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Takeuchi <i>et al.</i> , 1992
Cofomycine	herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Bush <i>et al.</i> , 1993
Composé P	analgésique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Tsuboya <i>et al.</i> , 1996
Phosphonothrixine	herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Nakamura <i>et al.</i> , 1999
Thiazolipyrindine	antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Sugawara <i>et al.</i> , 1999
Ammocydine	antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Murakami <i>et al.</i> , 2001
Phuraflavine	antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Vertesy <i>et al.</i> , 2001
Saccharomicines	antibiotique	<i>S. espanaensis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2001
Dithiopolynolones	antibiotique	<i>S. algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b
Pravastatine	anti-cholestérolémique	<i>S. mutabilis</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2003
Muctamycines C, PR, F, G	antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni <i>et al.</i> , 2004b; Zitouni 2005
Swalpanmycine B, aldgamycines G et H	antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni, 2005
Composés ZA01 et ZA02	antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni, 2005
Ammocidins B, C, D,	antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Murakami <i>et al.</i> , 2009
Dithiopolynolones	antibiotique	<i>S. algeriensis</i>	Menouche <i>et al.</i> , 2010
Dithiopolynolones	antibiotique	<i>S. algeriensis</i>	Menouche <i>et al.</i> , 2011
Chloramphénicol	antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Aouiche <i>et al.</i> , 2012
Dérivés de phthalate	antibactérienne, antilevurienne et antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Johnson <i>et al.</i> , 2012

Tableau 4. Principaux composés ayant une activité biologique et secrétés par le genre *Saccharothrix*.

* activité antibactérienne et/ou antifongique.

2.2.- Importance du genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* fait partie des actinomycètes rares très peu étudiés. Dans ce domaine, aucune donnée sur ce genre n'est disponible dans la littérature.

Cependant, dans notre laboratoire, des travaux effectués par Merrouche (2000) et Meklat (2004) ont montré l'efficacité des antibiotiques secrétés par *S. algeriensis* dans la lutte contre plusieurs maladies fongiques. En effet, l'utilisation de la thiolutine sécrétée par *S. algeriensis*, ainsi que de l'actinomycète lui-même, faisait baisser la population des agents pathogènes *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *F. o. f. sp. lini*, et réduisait fortement la fusariose du palmier dattier, de la tomate, des lentilles, du pois chiche et du lin, et également la maladie « tache chocolat » de la fève, due à *Botrytis fabae*.

Par ailleurs, les travaux menés par Muzammil (2012) ont permis d'évaluer les propriétés bioactives de *S. algeriensis* contre le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* et son impact très intéressant sur la réduction des maladies de plantes dues à ce champignon.

3.- Importance dans d'autres domaines

Les actinomycètes ont la capacité d'accumuler des métaux lourds à partir de leur environnement. Les quantités accumulées peuvent être importantes et une variété de mécanismes peut être invoquée depuis les interactions physico-chimiques comme l'adsorption et le dépôt jusqu'aux processus du métabolisme cellulaire (Das and Chandra, 1990, 2002; Desjardin *et al.*, 2002).

Les actinomycètes interviennent également dans la dégradation des hydrocarbures (Essien et Udosen, 2000), ainsi que 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).

Des souches appartenant à la famille des *Pseudonocardiaceae* et à des genres apparentés tels que *Amycolatopsis*, *Lentzea*, *Kibdelosporangium*, *Streptoalloteichus* et *Saccharothrix* sont utilisés dans la biodégradation des polylactides (PLA) (Tokiwa et Calabia, 2006).

Saccharothrix sp. PYX-6 isolé par Yuting *et al.* (2003) a montré de grandes capacités à dégrader le pyrène. La voie métabolique empruntée lors de ce processus a été également élucidée.

IV.- LES ANTIBIOTIQUES

1.- Définition

Les antibiotiques sont des molécules organiques synthétisées par des microorganismes (aujourd'hui, définition étendue aux molécules de synthèse) qui en solution à faible dose inhibent la croissance d'autres microorganismes ou les détruisent (Bugnicourt, 1995).

Les antibiotiques sont des produits du métabolisme bactérien et fongique. Ils sont produits essentiellement juste après la phase de croissance. Les antibiotiques peuvent agir sur la croissance des germes, interférer avec leur métabolisme énergétique ou inhiber la biosynthèse des composants cellulaires.

Un antibiotique est caractérisé par son spectre d'action, c'est-à-dire l'éventail des agents pathogènes sensibles à son action. Le spectre est directement lié à la structure chimique de l'antibiotique et à la cible microbienne.

2.- Classification générale des antibiotiques

Les antibiotiques constituent un groupe hétérogène de molécules biologiquement actives présentant différentes structures chimiques. Le nombre élevé de molécules disponibles a depuis longtemps imposé de les classer en regroupant les produits selon divers critères.

Bien que la classification la plus stable soit celle basée sur la structure chimique, d'autres classifications existent.

2.1.- Classification selon la structure chimique

La classification chimique permet de classer les antibiotiques en groupe assez homogènes, mais éloignés des objectifs cliniques. Cette classification fait apparaître neuf grandes familles présentées dans le tableau 5, et dont chacune comporte un certain nombre de sous-familles comprenant des antibiotiques très proches chimiquement et parfois même dans leur spectre et leur mode d'action.

Tableau 5. Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Berdy *et al.*, 1987).

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 accolés - 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 accolés - Hétérocycles accolés	- Mildiomycine - Phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	- Dérivés du furane - Polyéthers	- Monensine
Antibiotiques aromatiques	- Composés benzéniques - Composés aromatiques accolés - 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

2.2.- 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 encore sa charge électrique.

3.- Antibiotiques naturels antibactériens

Actuellement, l'activité antibactérienne des métabolites secondaires suscite un grand intérêt. Plusieurs recherches scientifiques sont en cours, et pourraient conduire à de nouveaux composés antibactériens efficaces contre les souches pathogènes pour l'homme et multirésistantes aux antibiotiques (Demain *et al.*, 2009).

Depuis la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming, produite par *Penicillium notatum*, d'autres antibiotiques furent recherchés à partir de microorganismes divers.

Waksman passa au crible des milliers de microorganismes. Avec Schatz et Bugie, il découvrit la streptomycine (1944) dans des cultures de *Streptomyces griseus* (in Moulin et Coquerel, 1998). Waksman découvrit aussi d'autres antibiotiques importants tels que l'actinomycine, la griséine, la néomycine, etc. (in Moulin et Coquerel, 1998).

Dans les années suivant la seconde guerre mondiale, d'autres antibiotiques majeurs furent découverts tels que la polymyxine B (1947) produite par *Bacillus polymyxa*, le chloramphénicol (1948) sécrété par *Streptomyces venezuelae*, la tétracycline (1948), l'érythromycine (1952), la vancomycine (1956), la kanamycine (1957), la lincomycine (1962), etc., élaborées par diverses espèces de *Streptomyces* (in Bergogne-Berezi et Dellamonica, 1999).

Ces dernières années, de nouveaux composés antibactériens ont été découverts, dont plusieurs sont sécrétés par des souches de *Streptomyces*, tels que les lipopeptides cycliques (Balz *et al.*, 2005), les platensimycines (Metzger *et al.*, 2009), les Streptogramines (Haste *et al.*, 2010), etc. D'autres composés antibactériens ont également été isolés à partir d'actinomycètes appartenant à des genres rares, comme c'est le cas des thiazomycines (Junker *et al.*, 2009) et de la pargamycine A (Hashizume *et al.*, 2010), élaborées par des espèces d'*Amycolatopsis*, ainsi que les polyketides polycycliques sécrétés par *Verrucosispora maris* (Roh *et al.*, 2011).

4.- Antibiotiques naturels antifongiques

Le développement de molécules antifongiques pour la médecine humaine n'a réellement débuté que vers 1980 (Gupte et Ganguli, 2002). Bien que ces molécules aient un rôle très important dans le traitement des infections fongiques, leur développement se heurte à plusieurs difficultés, qui sont:

- une forte toxicité, les cellules fongiques étant des cellules eucaryotes comme les cellules de mammifères, ce qui explique par ailleurs, le nombre restreint de molécules utilisables par voie systémique.
- une action *in vivo* le plus souvent fongistatique obligeant à des traitements prolongés avec un fort risque de rechutes chez les individus immunodéprimés.
- la paroi cellulaire constituée de chitine et de polysides (glucanes, mannanes) empêchant la pénétration de l'antifongique dans la cellule fongique.
- un retard considérable de la standardisation des tests *in vitro* permettant d'évaluer la sensibilité des souches aux molécules antifongiques.

Selon la nature des molécules antifongiques, nous distinguons deux groupes: les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques de structure non polyénique pouvant être antifongiques uniquement ou plus souvent antifongiques et antibactériens à la fois (Berdy *et al.*, 1987; Berdy, 2005).

4.1.- 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).
- 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, la pimaricine et d'autres.

Types de polyènes	Longueur d'onde (nm)			Exemples
	Premier pic	Deuxième pic	Troisième pic	
Triènes	283	272	262	Triénine
Tétraènes	318	304	291	Nystatine
Pentaènes	350	331	317	Eurocidines
Méthylpentaènes	357	340	323	Filipine
Carbonylpentaène:	364	Bande d'absorption étendue		Mycoticine
Hexaènes	380	358	340	Candihexine
Carbonylhexaènes	385	Bande d'absorption étendue		Dermostatine
Heptaènes	405	382	361	Amphotéricine B

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

4.2.- Les antifongiques non polyéniques

Ces molécules possèdent des structures chimiques très variées. Elles 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).

Les échinocandines et les pneumocandines sont respectivement des antifongiques lipopeptidiques et hexapeptidiques cycliques ayant une excellente activité *in vitro* et *in vivo* contre *Candida* et *Aspergillus* et permettent d'améliorer la survie dans le cas d'une 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 contre ceux qui sont résistants à d'autres agents antifongiques (Andriole, 1998; 2000).

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

5.- Microorganismes producteurs

La grande majorité des antibiotiques est produite par des microorganismes. Signalons cependant, l'intérêt qu'offrent les plantes supérieures dans cette production. Parmi les micro-organismes, les bactéries (y compris les actinomycètes) sont responsables d'environ 74% de la production, et les champignons de 22% (Lazzarini *et al.*, 2001, *in* Tiwari et Gupta, 2011).

5.1.- Les actinomycètes

Actuellement, la majeure partie des antibiotiques produits industriellement (environ 90%) sont sécrétés par les actinomycètes. Les deux tiers de toutes les substances bioactives d'origine microbienne connues sont produites par ces derniers (Hamaki *et al.*, 2005). Dans ce groupe bactérien, le genre *Streptomyces* produit à lui seul environ 46% des antibiotiques parmi les 8000 produits antimicrobiens décrits (Lazzarini *et al.*, 2001, *in* Tiwari et Gupta, 2011) (figure 2) et plusieurs sont commercialisés, à savoir, la streptomycine, la kanamycine, l'oxytétracycline, le chloramphénicol, l'érythromycine, la néomycine, la novobiocine et la nystatine.

De nombreuses recherches se sont récemment développées en vue de trouver de nouveaux antibiotiques produits par des actinomycètes appelés « rares », mais qui sont en fait les actinomycètes n'appartenant pas au genre *Streptomyces*. Ceux-ci sont à l'origine d'environ 11% des antibiotiques d'origine microbienne.

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.

5.2.- Les bactéries non mycéliennes et les champignons

En dehors des actinomycètes, les bactéries non mycéliennes produisent environ 17% des antibiotiques d'origine microbienne (Lazzarini *et al.*, 2001, *in* Tiwari et Gupta, 2011), et qui sont sécrétés surtout par les bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*. D'autres bactéries appartenant à des genres très divers tels que *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Proteus*, etc., produisent également quelques antibiotiques (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 β -lactamines (pénicillines et céphalosporines).

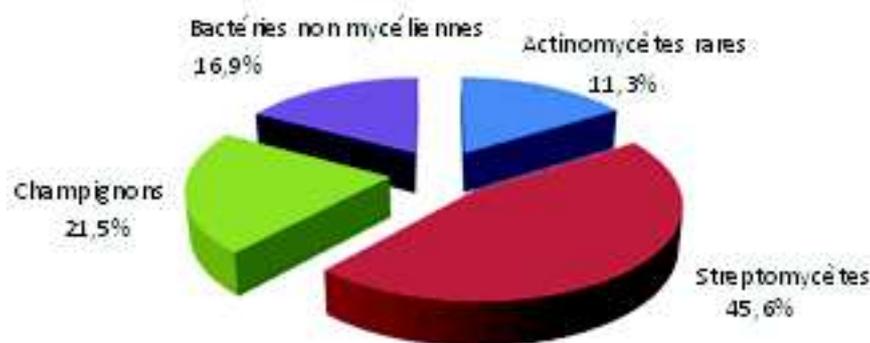


Figure 2. Groupes de microorganismes producteurs d'antibiotiques (Lazzarini *et al.*, 2001, *iniwari et Gupta*, 2011).

6.- Mode d'action des antibiotiques

Le mode d'action des antibiotiques est diversifié. Ils agissent par inhibition des réactions de synthèse variées en se fixant sur des sites précis ou cibles moléculaires.

6.1.- Inhibiteurs de la synthèse de la paroi

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 muréine et [les glycopeptides](#) se lient à un intermédiaire de synthèse du peptidoglycane).

La chitine, composant de la paroi fongique, est synthétisée essentiellement par des chitine-synthases. Les nikkomycines et les polyoxines sont des peptides nucléosidiques 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 glucanes 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).

6.2.- Action sur la membrane plasmique

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 polymyxines sont actives sur les bacilles à Gram négatif et les gramicidines et les tyrocidines sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif.

Les bénanomycines et les pradimicines agissent par complexion de leur groupe carboxyle libre avec la partie saccharide des mannoprotéines superficielles, suivie par l'action sur la membrane plasmique, causant la fuite du potassium intracellulaire (Sawada *et al.*, 1990; Ueki *et al.*, 1993).

L'amphotéricine B se fixe sur les stérols de la membrane fongique entraînant une perturbation de la perméabilité membranaire (augmentation anormale). Une fuite de certains éléments intracellulaires indispensables déclenche l'activation des enzymes autolytiques qui détruisent la cellule (Prescott, 2002).

6.3.- Inhibiteurs de la synthèse des protéines

Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique sont représentés par différentes classes d'antibiotiques et 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.

Les antifongiques tels que la blasticidine 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 ribosomique 60S, 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).

6.4.- Autres activités

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](#)).

La griséofulvine est un inhibiteur de la division nucléaire. 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, le fluoro-5-désoxyuridine monophosphate (F5dUMP) bloque la synthèse de l'ADN par inhibition de la thymidylate synthétase. Le fluoro-5-uridine triphosphate (F5UTP) inhibe la synthèse des protéines en s'incorporant au niveau de l'ARN fongique (Kerridge, 1986).

Les sphingolipides sont des cibles potentielles pour certains antifongiques (Gupte *et al.*, 2002), et l'haliangicine inhibe spécifiquement le transport des électrons dans le complexe III de la chaîne respiratoire. D'autres inhibiteurs comme les myxothiazoles, les mélithiazoles et les cystothiazoles sont connus (Fudou *et al.*, 2001a,b).

7.- Résistance des microorganismes aux antibiotiques

7.1.- Cas des bactéries

La phase d'industrialisation de la production des antibiotiques a pu faire croire à l'éradication des maladies infectieuses bactériennes. Malheureusement, des échecs thérapeutiques sont survenus à cause des souches pathogènes devenues résistantes alors qu'elles sont habituellement sensibles. Plus grave encore le cas des souches multirésistantes aux antibiotiques, car elles limitent considérablement les possibilités de traitement.

La résistance des bactéries aux antibiotiques peut être naturelle et se manifester par plusieurs mécanismes (Davies et Mazel 1997, Joffin et Leyral, 2006) : perméabilité limitée à l'antibiotique, absence de récepteur à l'antibiotique, ou diminution de son affinité ou modification de la cible, hyperproduction de la cible, production d'enzyme inactivant les antibiotiques, utilisation d'une voie métabolique détournée (création d'une fonction de remplacement) et expulsion active de l'antibiotique.

Par ailleurs, une souche sensible peut acquérir une résistance à un ou plusieurs antibiotiques, soit par mutation ponctuelle de l'ADN (la résistance concerne alors un seul antibiotique), soit par acquisition d'un plasmide auprès des souches déjà résistantes (la résistance acquise peut concerner alors plusieurs antibiotiques) (Skurnik *et al.*, 2007).

7.2.- Cas des champignons

A l'exemple des bactéries pathogènes pour l'homme qui deviennent résistantes aux antibiotiques ou encore des insectes qui deviennent résistants aux insecticides, plusieurs champignons pathogènes développent des formes de résistances aux antifongiques et aux fongicides.

Avant les années 1970, les champignons résistants aux fongicides étaient rares. Cependant, le phénomène est devenu fréquent. Il correspond à l'arrivée des fongicides systémiques (bénomyl, thiophanate-méthyle et méthalaxyl). Ces produits utilisés de manière continue et à grande échelle, ont provoqué l'apparition rapide de souches résistantes chez plusieurs champignons pour un ou plusieurs de ces fongicides.

Plusieurs mécanismes de résistance aux antifongiques sont décrits chez les champignons (Viguié, 2000); il s'agit de la modification ou la surexpression de la cible, la surexpression des pompes membranaires d'efflux et la faible affinité de l'antibiotique pour sa cible.

Une acquisition de la résistance peut faire suite à une modification génétique, soit par des mutations pouvant concerner un gène de structure codant pour la cible de l'antifongique, ou un gène régulateur. La résistance peut aussi résulter de l'amplification des gènes. Des phénomènes de recombinaison lors de la mitose sont également liés à la résistance aux antibiotiques. Coste *et al.* (2007) ont décrit la séquence des événements génétiques chez les souches de *Candida albicans* résistantes aux azolés.

8.- Production, purification et détermination des structures des antibiotiques

8.1.- Production

La production d'antibiotiques est l'un des secteurs les plus importants. Le criblage de souches productrices d'antibiotiques naturels a conduit à la production des antibiotiques dits de première génération. Les microorganismes producteurs (champignons et bactéries)

se caractérisent généralement par une production qui n'a lieu qu'après la croissance active, pendant des phases de stress, phases correspondant à des différenciations morphologique et physiologique. Cependant, dans certains cas, cette production peut débuter durant la phase exponentielle de croissance (Lebrihi *et al.*, 1987; Lamari *et al.*, 2002 ; Zitouni *et al.*, 2004b).

Soumise à un contrôle très strict, la production par des micro-organismes non génétiquement modifiés est toujours très faible. Très tôt, des programmes d'amélioration de la production par modification des souches ont été mis en œuvre. Ces programmes ont fait d'abord appel à la mutagenèse aléatoire. De nombreux progrès ont été réalisés: élucidation des voies métaboliques de synthèse des antibiotiques et des régulations de ces voies, étude des gènes impliqués, compréhension des mécanismes de résistance des souches aux antibiotiques qu'elles produisent, etc. Avec le développement du génie métabolique et du génie génétique, ces progrès permettent actuellement des modifications génétiques mieux ciblées. Les techniques récentes d'évolution moléculaire dirigée permettent même d'envisager la production de nouveaux antibiotiques hybrides par recombinaison de gènes entre diverses souches productrices. Ainsi, la production de pénicilline a pu être améliorée et dépasse actuellement les 40 g l^{-1} alors que les souches sauvages ne produisent que des traces d'antibiotiques ($1 \text{ à } 20 \text{ mg l}^{-1}$) (Larpent et Sanglier, 1989).

Au cours de la fermentation, le milieu de production doit d'abord permettre d'assurer une importante croissance pour conduire à une concentration élevée en cellule au moment de la production. Il doit assurer ensuite la maintenance de la vitalité des cellules et la production optimisée de l'antibiotique. Il doit de ce fait fournir des sources d'énergie et assurer les conditions physico-chimiques désirées (pH, température, oxygénation).

Les milieux doivent permettre de fournir sans limitation les précurseurs nécessaires aux synthèses des antibiotiques tout en évitant les phénomènes de répression et/ou d'inhibition.

Les oses, les polyholosides, les acides gras, les triglycérides et les protides fournissent les sources de carbone et d'énergie. Lors de la phase de croissance initiale, il est possible d'ajouter des sources d'énergie rapidement catabolisables assurant une croissance rapide, par exemple le glucose, mais il faudra veiller à ce que ce substrat soit totalement utilisé avant la phase de production pour éviter les phénomènes de répression catabolique de production. Pendant cette phase, les cellules utilisent des sources d'énergie et de carbone lentement catabolisables (lactose par exemple, pour la production de la pénicilline; dextrine ou amidon pour la production de Macrolides). L'ammonium est généralement la meilleure source d'azote pour assurer une croissance rapide. Cependant, de nombreuses synthèses peuvent être inhibées par des excès d'ions ammonium ou d'autres sources d'azote rapidement métabolisables (Larpent-Gourgand et Sanglier, 1992; Spížek et Tichý, 1995). En revanche, l'azote apporté sous forme de sources complexes, permet d'éviter le phénomène de répression catabolique, tout en remplissant de multiples fonctions. En effet, les farines de soja servent de source d'azote, mais elles apportent en même temps des acides nucléiques, des vitamines, des oligo-éléments, des lipides, du soufre et du phosphore. D'autres substances peuvent avoir un effet positif sur la production, comme c'est le cas du CaCO_3 qui joue le rôle de tampon empêchant des variations importantes du pH et favorisant ainsi la production de la biomasse et des antibiotiques. Plusieurs travaux ont rapporté l'utilisation bénéfique du CaCO_3 lors des cultures des actinomycètes (Igarashi *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 2000).

8.2.- Purification

La première étape de la purification des antibiotiques est une extraction liquide-liquide, le solvant ne devant pas être miscible à l'eau. Cette étape d'extraction des produits actifs du filtrat de culture est réalisée pour séparer l'antibiotique qui est présent à des concentrations relativement faibles d'un mélange constitué par les éléments du milieu et de nombreux métabolites microbiens. C'est souvent une extraction avec utilisation de solvants organiques de polarités différentes. Il convient de tester les différents extraits organiques (et la phase résiduelle aqueuse) afin de déterminer le solvant le plus approprié pour les extractions ultérieures.

Les étapes suivantes font appel à des techniques de purification raffinées pour éliminer spécifiquement les impuretés en jouant sur leurs propriétés comparées à celles de l'antibiotique. Les méthodes de purification dépendent des caractéristiques de la molécule à déterminer et de sa concentration dans le milieu de culture. Ces techniques sont souvent accompagnées de tests de révélations chimiques (chromogéniques) et spectroscopiques (UV-visible, infrarouge) pour la détection des antibiotiques, ainsi que pour avoir des informations sur leur nature. Tout au long du processus de purification, il est important d'effectuer des contrôles microbiologiques (antibiographie et bioautographie). Il s'agit d'utiliser aussi des techniques de chromatographie sur papier, sur couche mince (CCM), sur colonne à basse pression ou encore à haute pression. Cette dernière, appelée 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. Ces méthodes conduisent à des degrés de pureté compatible avec les utilisations médicales.

Un exemple de protocole général de purification souvent rencontré dans le cas des antibiotiques est illustré par la figure 3.

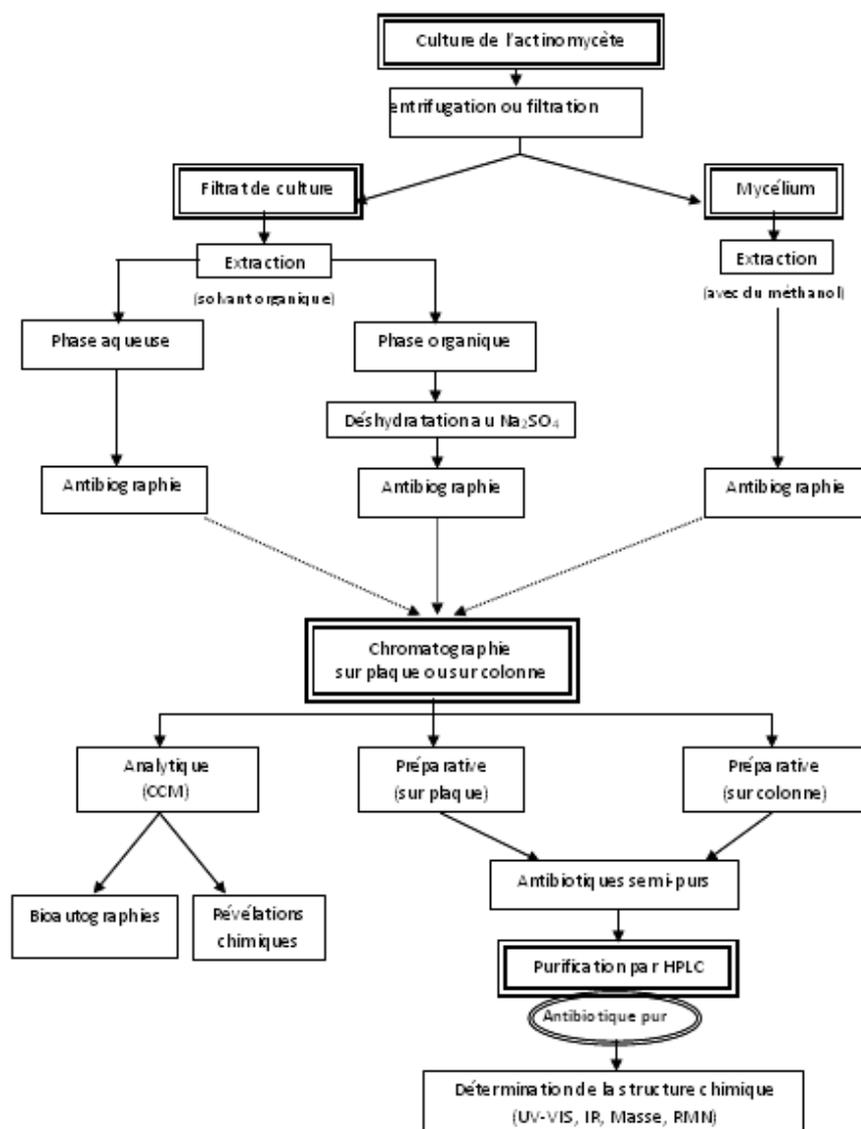


Figure 3. Exemple de protocole général de purification et d'analyse des antibiotiques.

8.3.- Détermination des structures chimiques

L'approche souvent envisagée pour déterminer les structures chimiques des antibiotiques est une résultante qui combine plusieurs méthodes spectroscopiques traditionnelles employées pour les études structurales. Nous citerons la spectrométrie de masse (MS), la spectroscopie d'absorption en lumière ultra-violette et visible (UV-VIS), la spectroscopie infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN du proton et du carbone-13). Cette démarche est sans aucun doute la plus fiable, en partie grâce à la RMN du carbone-13 qui apporte des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule.

La spectroscopie UV-visible 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 (NH₂, 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 des molécules. Les spectres 2D aident à interpréter les spectres 1D puisque en une seule expérience, les protons sont couplés entre eux (COSY, ¹H-H) ou couplés avec les carbones correspondants (HMBC, ¹³C-¹H).

9.- Recherche de nouvelles molécules actives

De nouveaux agents antimicrobiens sont nécessaires pour lutter contre le nombre croissant de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques. Ainsi, des bio-prospections des habitats en produits naturels tels le sol et l'eau offrent des ressources potentiellement riches en nouveaux microorganismes et peuvent être exploités dans les programmes de dépistage de nouveaux produits naturels (Long *et al.*, 1994). Certains auteurs rapportent que 99% des bactéries de diverses espèces sont inexplorées (Davies, 1999; Watve *et al.*, 2000). Le milieu naturel demeure la source la plus probable pour découvrir de nouveaux antibiotiques. Les actinomycètes rares constituent une étape cruciale dans ce contexte (Cai *et al.*, 2009).

9.1.- Recherche par voie naturelle

Parmi les microorganismes, les actinomycètes continuent d'être l'un des groupes les plus étudiés pour le dépistage de nouvelles molécules bioactives. Ces dernières années, le taux de découverte de nouveaux antibiotiques chez le genre *Streptomyces* (genre à partir duquel un grand nombre d'antibiotiques a été isolé et étudié) a baissé (Solanki *et al.*, 2008). La raison est que la recherche de nouveaux composés a été orientée vers ceux sécrétés par des espèces appartenant à des genres autres que *Streptomyces*, appelés parfois actinomycètes rares.

En effet, les actinomycètes rares constituent une des sources les plus prometteuses pour découvrir de nouveaux métabolites bioactifs et deviennent des microorganismes-cibles dans ce contexte. L'intérêt que suscitent les actinomycètes rares dans ce domaine est surtout lié au fait que de nombreux antibiotiques intéressants ont été isolés de genres rares ou peu

fréquents tels que *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora* et *Streptosporangium* (Genilloud *et al.*, 2011) (figure 4).

Les actinomycètes rares sont considérés comme étant les souches d'actinomycètes dont la fréquence d'isolement est beaucoup plus faible que celle des souches de streptomycètes isolées par les méthodes conventionnelles. Ainsi, le développement des méthodes d'isolement sélectif, principalement appliquées par des chercheurs dans l'industrie pharmaceutique, a conduit à la découverte de nouveaux produits microbiens d'une grande importance médicale (Lazzarini *et al.*, 2001).

Par ailleurs, l'exploration des écosystèmes particuliers et des habitats les moins exploités ont été d'un succès remarquable. En effet, plusieurs actinomycètes rares ont été isolés et sont à l'origine de nouvelles sources d'antibiotiques (Sanglier *et al.*, 1996; Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004b,c; Bull et Stach 2007).

Les actinomycètes rares ne sont pas faciles à isoler. Plusieurs méthodes ont été développées dans ce sens, afin d'éliminer les bactéries non mycéliennes, les champignons et les *Streptomyces* qui sont très abondants. Ces méthodes sont basées sur différentes approches, tels que:

- le choix du milieu de culture favorable, notamment les milieux "chitine-vitamines agar" et "acides humiques-vitamines agar", ainsi que le milieu "charbon-vitamines agar" (Hayakawa et Nonomura, 1984; 1987).
- l'utilisation des antibiotiques et autres agents antibactériens; 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 antibactériens 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 (Boudjella, 1994).
- Le pré-traitement des sols est l'une des méthodes employées pour l'isolement sélectif des actinomycètes. Il peut se faire en utilisant la chaleur sèche (Zakharova *et al.*, 2003), les pulsations électriques et les radiations (Li *et al.*, 2002) ou encore les agents chimiques germicides (Hayakawa *et al.*, 1997).

D'autres méthodes furent également développées, comme celle du "baiting" en utilisant la paraffine comme seule source de carbone, pour détecter la présence des *Nocardia* (Orchard *et al.*, 1977). Palleroni (1980) et Hayakawa *et al.*, 1991 exploitèrent 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 appartenant aux genres *Planomonospora*, *Planobispora* et *Sporichthya* (Makkar et Cross, 1982; Suzuki *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000).

Des résultats remarquables ont été obtenus dans notre laboratoire en combinant ces différentes méthodes d'isolement (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2004a; Zitouni *et al.*, 2004b; Boudjella, 2007).



Figure 4. Distribution relative des souches productrices d'antibiotiques parmi les actinomycètes rares (base de données ABL, en accord avec la classification récente publiée dans « Atlas of Actinomycetes », Japon)

(Lazzarini, 2001, in Tiwari et Gupta, 2011).

9.2.- Recherche par voie chimique: synthèse et hémisynthèse

La découverte de nouveaux antibiotiques s'appuie également sur la synthèse chimique de nouvelles molécules, ou de molécules existantes modifiées, comme dans le cas de l'hémisynthèse. Celle-ci consiste à développer des dérivés d'antibiotiques dont on dispose, de façon à avoir des molécules plus actives, soit en modifiant la molécule d'origine de manière à la faire agir sur une cible légèrement différente, soit en lui adjoignant un inhibiteur du mécanisme de résistance lorsque celui-ci est connu. Dans ce domaine là, c'est les antifongiques de synthèse qui sont les plus répandus. Le meilleur exemple est celui des dérivés des triazolés tels que le posaconazole, le ravuconazole ou le voriconazole (Maillié et Bastide, 2001). D'autres exemples incluent les carbazoles dications-substitués, les furanes et les benzimidazoles. Les échinocandines inhibent la synthèse du β -1-3-glucane fongique et cela représente la première nouvelle cible en 20 ans de recherche de médicaments antifongiques cliniquement utiles.

Les nouvelles molécules actives font l'objet de nombreux tests pharmacologiques de non toxicité et d'efficacité. Seul un petit nombre d'entre elles peuvent être utilisées en thérapeutique. Le mode de synthèse ultérieur de l'antibiotique est déterminé ensuite par des critères purement économiques. A l'heure actuelle, la complexité des molécules antibiotiques est telle que les méthodes purement chimiques ne sont pas économiquement rentables. La voie biologique reste la voie principale de synthèse de la plupart des antibiotiques (Joffin et Leyral, 2006).

PARTIE II MATERIEL ET METHODES

I.- ISOLATS D'ACTINOMYCETES

1.- Origine des isolats

Les actinomycètes SA198 et SA181 proviennent de sols du Hoggar, dans la région de Tamanrasset (extrême Sud algérien) et SA152 d'un sol de la palmeraie d'Adrar (Sud-Ouest algérien). Ils ont été isolés par Zitouni (1995), par la méthode des suspensions-dilutions en utilisant le milieu acides humiques - vitamines Bagar (SA152 et SA181) et le milieu chitine - vitamines B agar (SA198) (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionnés d'actidione ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$).

2.- Purification et conservation des isolats

Les trois isolats d'actinomycètes sont purifiés par striage sur milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project) à base de glucose, d'extrait de malt et d'extrait de levure (Shirling et Gottlieb, 1966) (annexe 1) coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Ce milieu permet une bonne croissance, ainsi qu'une bonne sporulation des isolats.

Les cultures pures sont repiquées sur le même milieu coulé en tubes inclinés et conservées à 4°C . Les isolats ont également été conservés dans une solution aqueuse de glycérol à 20%. Pour cela, après une incubation à 30°C pendant 8 jours et une bonne sporulation, les spores sont grattées et transférées dans des cryotubes contenant du glycérol stérile à 20% dans de l'eau. Les cryotubes sont conservés à -20°C .

II.- ETUDE TAXONOMIQUE DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES

1.- Etude morphologique

Cette étude est basée sur les caractéristiques culturales (croissance, couleur des mycéliums aérien et du substrat, ainsi que celle des pigments solubles) et micromorphologiques (sporulation, agencement des spores, fragmentation ou non des mycéliums). Elle consiste en une observation macromorphologique et micromorphologique des colonies sur différents milieux de cultures.

1.1.- Caractéristiques macromorphologiques

Elles sont déterminées sur milieux de culture solides, ISP2, ISP3, ISP4 et TSA (Shirling et Gottlieb, 1966), ainsi que sur Bennett et gélose nutritive (Waksman, 1961) (la composition

des milieux de culture est donnée en annexe 1). Cette étude consiste à noter au 7ème, 14ème et 21ème jours d'incubation à 30°C, la croissance de la souche, l'aspect et la couleur des mycéliums aérien et du substrat, ainsi que la production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu. La production ou non de pigments mélanoides est observée sur les milieux ISP6 et ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966; voir annexe 1).

Les couleurs des mycéliums aérien et du substrat sont définies à l'aide d'une charte de couleurs (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color ISCC-NBS).

1.2.- Caractéristiques micromorphologiques

Les trois isolats d'actinomycètes sont observés sur les différents milieux cités précédemment, à l'aide d'un microscope optique Zeiss, à deux grossissements (x100 et x400). Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce, pour étudier les structures en place sans les altérer.

Les mêmes isolats ont fait l'objet d'une observation au microscope électronique à balayage (model S450 HITACHI, Japon) au centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie de la Faculté de Médecine de Toulouse (France). Pour cela, des disques de 0,5 cm de diamètre sont découpés à partir de cultures bien sporulées âgées de 8 jours et poussant sur ISP2. Les disques sont fixés dans une solution de fixation [2 volumes de glutaraldéhyde à 4%, 1 volume de cacodylate (pH= 7,4; 0,4M) et 1 volume d'eau distillée] pendant 4 h à 4 °C. Après rinçage à l'eau distillée (trois lavages pendant 10 min chacun), les échantillons sont déshydratés avec des concentrations croissantes d'alcool éthylique (50, 70, 80, 90 et 100% pendant 10 min pour les 4 premières concentrations et trois fois 15 min pour la dernière concentration), puis séchés dans un bain d'hexaméthyl disilazane pur pendant 3 min. Les échantillons sont ensuite placés sur des plots en aluminium et métallisés à l'or et au palladium par évaporation cathodique (1,2 volt, 10 mA, 100 Å.mn⁻¹) pendant 3 à 4 min.

2.- Etude chimique des constituants cellulaires

Cette étude, en plus de l'étude morphologique, permet l'identification du genre.

Elle consiste à déterminer l'isomère de l'acide diaminopimélique (LL ou DL = *méso*) et la présence ou non de la glycine au niveau de la paroi cellulaire, la composition cellulaire en sucres, le type de phospholipides membranaires, ainsi que la composition membranaire en acides gras et en ménaquinones.

2.1.- Obtention de la biomasse mycélienne

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés en milieu ISP2 liquide (100 ml de milieu de culture dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml) agité à 140 rpm et incubés à 30°C pendant 5 jours. Lorsque les cultures deviennent denses, le mycélium est récupéré par filtration, lavé plusieurs fois à l'eau distillée et une dernière fois à l'éthanol, puis séché à 30°C durant une nuit.

2.2.- Identification des acides aminés pariétaux

Il s'agit de déterminer l'isomère diaminopimélique (DAP) et de noter la présence ou non de la glycine. La méthode utilisée est celle de Becker *et al.* (1964). Elle consiste à rechercher les

acides aminés pariétaux après une hydrolyse cellulaire assez forte à l'acide chlorhydrique. Les étapes suivies sont les suivantes:

- 10 mg de mycélium sec de chaque isolat d'actinomycète sont hydrolysés pendant 18 h à 100°C, par 100 ml d'acide chlorhydrique 6 N dans des tubes à vis hermétiquement fermés.
- Les hydrolysats sont filtrés sur membrane en verre pour éliminer les débris mycéliens.
- Les filtrats sont évaporés à sec dans un bain de sable chaud.
- Chaque résidu est lavé 3 à 4 fois à l'eau distillée (3 ml) jusqu'à élimination complète de l'acide chlorhydrique et obtention d'un pH compris entre 5,5 et 7.
- Le résidu sec est repris dans 0,3 ml d'eau distillée.
- 15 µl de chaque hydrolysats, ainsi que 25 microlitres d'une solution à 0,01 M d'acide diamino pimélique (mélange des isomères LL et DL) et d'une solution de glycine à 0,2% (utilisés comme témoins) sont déposés sur du papier Whatman n° 1 (60 X 50 cm).
- Les papiers sont développés pendant 18 h par chromatographie descendante à front perdu dans un solvant composé de méthanol, eau distillée, acide chlorhydrique 10 N et pyridine (80/17,5/2,5/10 en volume).
- Après séchage du papier à température ambiante, la révélation des chromatogrammes se fait par une solution de ninhydrine à 0,2% (w/v) dans de l'acétone suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5 min.

Les taches de DAP sont de couleur olive virant par la suite au jaune vif. La forme LL migre plus vite que la forme DL. La glycine apparaît de couleur violette et migre plus rapidement que les isomères de DAP.

2.3.- Identification des sucres cellulaires

La méthode utilisée est celle de Lechevalier et Lechevalier (1970). Elle consiste à caractériser les sucres cellulaires après une hydrolyse ménagée avec de l'acide sulfurique.

- 50 mg de mycélium sec sont hydrolysés par 1 ml d'acide sulfurique 1 N dans des tubes scellés à 100°C pendant 2 h.
- Les hydrolysats sont neutralisés avec une solution saturée d'hydroxyde de baryum jusqu'à obtention d'un pH neutre. Le précipité blanc qui se forme est éliminé par centrifugation (4000 g pendant 20 min) et le surnageant est recueilli.
- Le surnageant est évaporé à sec à 40°C, puis repris dans 0,3 ml d'eau distillée.
- 20 µl d'hydrolysats sont chromatographiés sur papier Whatman n° 1, ainsi que 15 µl de solutions aqueuses standards des sucres témoins suivants: arabinose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, ribose et xylose (0,1%, w/v).
- Les papiers sont développés par chromatographie descendante (à front perdu) pendant 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 séchés à température ambiante.
- Les chromatogrammes sont révélés à l'aide d'une solution de phtalate d'aniline à 0,2% (w/v) en chauffant 5 min à 100°C. Les taches sont de couleur rose pour les pentoses et brune pour les hexoses.

2.4.- Identification des phospholipides membranaires

Cette étape est également importante dans la taxonomie des actinomycètes, surtout en ce qui concerne la différenciation entre des genres morphologiquement proches tels que *Saccharothrix* et *Nocardiosis*. La méthode utilisée est celle préconisée par Minnikin *et al.* (1977).

- 1 mg de mycélium sec est agité durant une nuit à température ambiante dans 40 ml du mélange chloroforme-méthanol (2-1; v/v) contenu dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml hermétiquement fermée.
- L'extrait organique est récupéré et évaporé à sec à 37°C.
- Le résidu est dissout dans 0,3 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (2-1, v/v).
- 10 µl de l'extrait organique de chaque échantillon sont spotés en double dans deux plaques différentes.
- 10 µl de solutions témoins (0,01 g dans 1 ml de chloroforme) de phosphatidyléthanolamine (PE) et de phosphatidylcholine (PC) sont également chromatographiés.
- Le système de solvant utilisé est un mélange de chloroforme-méthanol-eau distillée (65/25/4, v/v). La migration est dans ce cas unidimensionnelle et l'expérience servira juste à savoir si la PE et la PC sont présentes.
- Une des plaques est révélée avec le réactif de Dragendorff selon Munier et Macheboeuf (Merck, 1975) pour la détection de la PC, et l'autre plaque par une solution de ninhydrine pour la détection de la PE (annexe 2).
- les plaques sont chauffées à 100°C pendant 5 min. la PC apparaît de couleur jaune orange vif et la PE de couleur violette.

Pour les isolats SA152 et SA181, l'expérience a été refaite par le laboratoire de Microbiologie de la "German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)" en Allemagne, par CCM bidimensionnelle, afin de détecter non seulement la PE et la PC, mais aussi les autres phospholipides membranaires (voir méthode en annexe 2).

2.5.- Identification des acides gras membranaires

Cette analyse a également été réalisée au laboratoire de Microbiologie de la DSMZ. La méthode utilisée pour identifier les acides gras est celle recommandée par Sasser (1990). La caractérisation de ces acides se fait en cinq étapes. Quatre réactifs sont nécessaires pour pouvoir libérer, estérifier et extraire les acides gras des cellules vivantes. Ces étapes sont les suivantes:

2.5.1.- Récolte des cellules

Un inoculum de 40 mg est prélevé à partir d'une culture d'actinomycète poussant sur gélose nutritive, à 28°C pendant 6 à 10 jours. L'inoculum est introduit dans un tube à vis (13 x 100mm).

2.5.2.- Saponification

Un millilitre du réactif 1 (réactif de saponification), composé de 45 g d'hydroxyde de sodium (NaOH), de 150 ml de méthanol et de 150 ml d'eau distillée, sont additionnés dans les différents tubes contenant les cellules à analyser. Les tubes sont parfaitement scellés. Ils sont ensuite vortexés pendant 5 à 10 s et placés dans un bain Marie à 100°C pendant 5 min. Les tubes sont retirés du bain puis vortexés vigoureusement pendant 5 à 10 s, et remis une deuxième fois au bain Marie à 100°C pendant 25 min. Après saponification au bain Marie, les tubes sont retirés et refroidis à température ambiante.

2.5.3.- Méthylation

Deux millilitres du réactif 2 (réactif de méthylation), composé de 325 ml de HCl 6 N et de 275 ml de méthanol sont rajoutés aux différents tubes à analyser, lesquels sont ensuite scellés. Les tubes sont vortexés pendant 5 à 16 s, puis incubés au bain Marie à 80°C (± 1) pendant 10 min. Ils sont ensuite refroidis à température ambiante.

2.5.4.- Extraction

Des volumes de 1,25 ml du réactif 3 (réactif d'extraction), composé de 200 ml de *n*-hexane et d'heptane (v/v) sont additionnés aux tubes refroidis. Les tubes (une fois scellés) sont inclinés et agités pendant 10 min (agitation douce). La phase aqueuse est éliminée et la phase organique est conservée pour la dernière étape de l'expérimentation.

2.5.5.- Lavage

Trois millilitres du réactif 4 (solution de lavage), composé de 10,8 g de NaOH solubilisés dans 900 ml d'eau distillée, sont rajoutés à la phase organique conservée dans des tubes. Après une agitation de 5 min, les 2/3 de cette phase organique sont transférés dans des tubes pour CPG et seront prêts à être analysés.

Un CPG Thermoscientifique, composée d'un injecteur Trace GC 2000 et d'un détecteur de masse Trace DSQ, est utilisé dans les conditions suivantes:

- Colonne Zebron (ZB 5MS, 30 mètres, 0,25 nm, 0,25 μ m) société Phenomenex (USA).
- Température de ligne de transfert: 220°C.
- Mode d'injection Split/Splitless.
- Programme d'analyse: température initiale du four, 65°C pendant 0,5 min, 60°C jusqu'à 140 °C pendant 4 min, 140°C jusqu'à 240°C pendant 4 min et 240°C pendant 15 min.
- Débit: 1 ml min⁻¹ sous hélium (qualité α 2).
- Programme du détecteur: multiplication des électrons à 1453 Volts, température de source d'ions à 200°C, gamme de masse: 40 à 450 en UMA (Unité de Masse Atomique), enregistrement des données de 6 à 35 min (après 6 min, temps nécessaire pour éliminer le solvant d'extraction).
- Un standard composé d'esters méthyliques d'acides gras (10 mg ml⁻¹) est utilisé.

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

2.6.- Identification des ménaquinones membranaires

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

- A 100 mg de matériel cellulaire lyophilisé sont additionnés 2 ml d'une solution aqueuse de méthanol (composée de 10 ml de NaCl à 0,3% et de 100 ml de méthanol) et 2 ml d'un mélange pétrole- éther (60–80°C).
- Le mélange est homogénéisé durant 15 min puis centrifugé à une faible vitesse pendant 5 min.

- A la phase aqueuse sont additionnées 1 ml d'éther de pétrole (b.p.60–80°C). Après une homogénéisation durant 15 min, suivie d'une centrifugation pendant 5 min, le surnageant est concentré à sec.
- Le résidu sec est dissout dans 100 µl d'acétone. Les échantillons sont ainsi prêts à être chromatographiés sur couche mince (plaques de 20 x 20 cm, gel de silice GF 254 nm type 60, épaisseur de la couche de gel, 0,5 mm). Des standards connus sont utilisés pour l'analyse des quinones. Les plaques sont développées dans le système de solvants éther de pétrole-diéthyl éther (85:15 v/v). Elles sont ensuite séchées sous hotte et visualisées sous UV. Les quinones apparaissent de couleur bleu sombre sur un fond vert fluorescent à 254 nm. Les spots marqués sont grattés et repris dans le diéthyl éther. L'échantillon est réduit à sec, dissout dans 100 µl d'isopropanol et filtré, puis transféré dans un tube à essai de 1 ml.

Les extraits sont analysés par chromatographie sur couche mince ou par chromatographie liquide à haute performance.

3.- Etude physiologique

Les tests physiologiques utilisés dans notre étude, sont ceux utilisés habituellement par les taxonomistes pour la différenciation des espèces d'actinomycètes. Les méthodes sont détaillées en annexe 1.

Au total 55 tests ont été retenus pour l'identification des trois isolats d'actinomycètes.

3.1.- Utilisation des composés glucidiques comme seules sources de carbone

Ce test consiste à apprécier la croissance de chaque isolat en présence de composés glucidiques (comme seule source de carbone) en utilisant le milieu de base préconisé par Gordon *et al.* (1974)

(annexe 1).

Le test est considéré comme positif lorsque la croissance de l'isolat contenant le composé glucidique est supérieure à celle du témoin sans sucres.

Les glucides testés sont les suivants: adonitol, arabinose, cellobiose, dextrine, fructose, galactose, glucose, glycérol, inositol, lactose, maltose, mannitol, mélibiose, α méthyl-D-glucoside, mélézitose, ribose, raffinose, rhamnose, saccharose, sorbitol, tréhalose et xylose.

3.2.- Dégradation de divers autres composés organiques

Ces tests consistent en la dégradation du Tween 80 (Sierra, 1957), de la testostérone (Goodfellow, 1971), de l'amidon, de l'arbutine, de l'esculine, de la caséine du lait, de la guanine, de l'hypoxanthine, de la tyrosine et de la xanthine (Gordon *et al.*, 1974).

3.3.- Décarboxylation des acides organiques

La méthode employée est celle de Gordon *et al.* (1974). Les acides organiques (sous forme de sels de sodium) sont l'acétate, le benzoate, le butyrate, le citrate, l'oxalate, le propionate, le pyruvate, le succinate et le tartrate de sodium.

3.4.-Utilisation des acides aminés

Les acides aminés (proline, sérine et alanine) ont été utilisés comme seule source de carbone et d'azote. Ils sont additionnés au milieu de base préconisé par Goodfellow *et al.* (1971) (annexe 1). Le test est considéré comme positif lorsque la croissance de l'isolat sur le milieu contenant l'acide aminé est supérieure à celle du témoin sans acides aminés.

3.5.- Production de nitrate réductase

La production de nitrate réductase est observée sur bouillon nitrate (Marchal et Bourdon, 1977).

3.6.- Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Pour évaluer la sensibilité des isolats vis-à-vis de certains agents physiques et chimiques, certains tests préconisés dans la taxonomie des actinomycètes (Athalye *et al.*, 1985) sont réalisés:

- Croissance à pH 5 et 9 (GYEA liquide).
- Croissance à 37°C et 45°C (ISP2 solide).
- Croissance en présence de chlorure de sodium (4 et 5%) (ISP2 solide).
- Sensibilité aux antibiotiques (ISP2 solide) suivants: chloramphénicol (30 µg ml⁻¹), érythromycine (15 µg ml⁻¹) et novobiocine (5 µg ml⁻¹).

4.- Etude moléculaire

4.1.- Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S

Cette étude est basée sur l'extraction et l'amplification par la réaction en chaîne polymérase (PCR) de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S et la détermination de sa séquence. Une fois déterminée, cette dernière est comparée avec celles des espèces de références après alignement automatique (méthode du blast), en utilisant un logiciel qui permettra d'obtenir les pourcentages de similarités et de déterminer les espèces.

4.1.1.- Extraction de l'ADN génomique

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

L'ADN est obtenu à partir d'un prélèvement direct de colonies sur milieu solide ISP2.

Après lavage du mycélium à l'eau bidistillée stérile, celui-ci peut être immédiatement utilisé pour l'extraction de l'ADN ou bien conservé à - 20°C pour une utilisation ultérieure.

- Mettre dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml, 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%.
- Ajouter en dispersant une petite quantité de mycélium à l'aide d'une spatule stérile et laisser pendant 10 min à température ambiante.

- Ajouter 150 µl d'une solution 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, centrifuger à 10 000 g pendant 1 min, transvaser le surnageant dans un autre tube Eppendorf, centrifuger comme précédemment et transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter un volume égal d'isopropanol et mélanger le tube brièvement par inversion, puis centrifuger à 10 000 g pendant 2 min et éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN avec 300 µl d'éthanol à 70%, centrifuger à 10 000 g pendant 1 min, éliminer le surnageant et sécher le culot (l'ADN) à l'air; suspendre de nouveau le culot dans 50 µl d'eau bidistillée stérile.

4.1.2.- Quantification de l'ADN

Pour contrôler sa pureté, 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:

$$[\text{ADN}] = DO_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{facteur de dilution } (\mu\text{g ml}^{-1}).$$

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

4.1.3.- Electrophorèse en gel d'agarose

La taille du produit PCR est 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 $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 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 des échantillons après électrophorèse, un marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (Promega) 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 taille connue qui serviront de référence pour estimer la taille des 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.

4.1.4.- Amplification par PCR

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 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 µl:

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

MgCl₂: 1,5 mM.

dNTP: 200 µM.

Amorce 27f : 1 µM.

Amorce 1492r: 1 µM.

Taq DNA polymérase: 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 la 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 amplifiats obtenus sont visualisés sur gel d'agarose comme décrit précédemment.

4.1.5.- Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

La détermination des séquences est effectuée par la compagnie MilleGen (Toulouse, France), en utilisant un séquenceur automatique et les mêmes amorces utilisées lors de la PCR. Les séquences, une fois déterminées, sont comparées à celles des espèces disponibles dans les banques génomiques de données en utilisant le "NCBI Blast" disponible sur Internet au niveau du site Web: ncbi.nlm.nih.gov ainsi que EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/> ; Kim *et al.*, 2012).

4.1.6.- Analyses phylogénétiques

Une fois les séquences déterminées, elles sont utilisées pour connaître la position phylogénétique de l'actinomycète. 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 du "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).

4.2.- Hybridation ADN-ADN

Elle n'a été réalisée que pour les isolats d'actinomycètes SA152 et SA181. Elle consiste en la réassociation des brins linéaires complémentaires d'ADN cibles et les brins de la sonde.

La méthode utilisée est celle préconisée par De Ley *et al.* (1970) modifiée par Huss *et al.* (1983). Cette méthode consiste à hybrider deux ADN de deux souches bactériennes. La première est une souche de référence dont le nom est connu, alors que la deuxième est supposée proche de la première. Puis par la suite, le pourcentage de renaturation entre les deux ADN est mesuré.

4.2.1.- Extraction de l'ADN

L'ADN génomique des isolats SA152 et SA181, ainsi que celui des souches de référence les plus proches phylogénétiquement a été obtenu par extraction physique en utilisant la "French presse" à une pression de 700 à 1000 psi. La qualité de l'ADN extrait est vérifiée par spectrophotomètre comme nous l'avons déjà décrit dans le paragraphe 4.1.2.

4.2.2.- Dénaturation et hybridation

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

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

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

Les mesures sont réalisées pour 4 cuves contenant:

- 1^{ère} cuve: le blanc correspondant au pourcentage de formamide utilisé lors de la mesure de la courbe de fusion.
- 2^{ème} cuve: l'ADN de la souche notée A.
- 3^{ème} cuve: l'ADN des deux souches A et B.
- 4^{ème} cuve: l'ADN de la souche notée B.

La dénaturation de l'ADN est obtenue par un système intégré à l'appareil d'hybridation (semblable à celui de thermocycleur) et il est programmé automatiquement par un ordinateur. Ce système permet l'augmentation de la température à 65°C pendant 20 min. Au cours de la dénaturation, une courbe de température de fusion de l'ADN est obtenue; cela

permet de diminuer la température de fusion des échantillons. La dénaturation est réalisée à une température inférieure de 0,7°C à la température de fusion déterminée.

L'hybridation est programmée ensuite automatiquement par ordinateur et dure 30 min.

4.2.3.- Lecture des résultats

La lecture des résultats est réalisée par un ordinateur muni d'un logiciel qui permet de lire la densité optique mesurée à 260 nm par un spectrophotomètre modèle "Cary 100 Bio UV/VIS". Ce dernier est équipé d'un "Peltier-thermostated 6×6 multicell changer" et d'un contrôleur de température avec une sonde de température *in situ* "Varian Medical Systems, Palo Alto, CA".

Les valeurs des taux d'hybridation sont calculées par un logiciel intégré au système de lecture et sont données directement.

Un pourcentage d'hybridation inférieur à 70% indique que les deux souches appartiennent à des espèces différentes (Wayne *et al.*, 1987).

III.- PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DE SACCHAROTHRIX SUR MILIEUX SOLIDES

L'activité antibactérienne, antifongique et antilevurienne des trois isolats d'actinomycètes a été évaluée sur les milieux ISP2 et Bennett par la méthode des stries croisées.

1.- Microorganismes-cibles

Les microorganismes-cibles sont les suivants:

- Bactéries à Gram positif: *Bacillus coagulans*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*.
- Bactéries à Gram négatif: *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica* et *Serratia marcescens*.
- Champignons filamenteux: *Ascochyta fabae*, *Aspergillus carbonarius*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Aspergillus sp.*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *Mucor ramannianus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium.sp.* et *Phoma sp.*
- Levures: *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les microorganismes-cibles proviennent de la collection de notre laboratoire, Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM).

2.- Tests d'antagonisme par la méthode des stries croisées

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés en un seul trait à la surface des milieux ISP2 et Bennett et en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les microorganismes-cibles sont ensemencés par stries perpendiculairement à l'actinomycète.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance d'inhibition entre les bordures de la souche-cible et l'isolat d'actinomycète, après 24 h d'incubation pour les bactéries et les levures et 36 h pour les champignons.

IV.- ETUDE DES ANTIBIOTIQUES SECRETES PAR SACCHAROTHRIXSA198

L'isolat d'actinomycète SA198 a été sélectionné en raison de sa forte activité pour étudier ses antibiotiques.

1.- Cinétiques de production des antibiotiques en milieu liquide

Les cinétiques de production des antibiotiques, ainsi que celles du pH ont été menées dans deux milieux de culture, ISP2 et Bennett. Elles permettront de déterminer le temps de production optimal, et de comparer cette production dans les deux milieux testés.

1.1.- Pré-cultures

Des tubes contenant 3 ml de milieu ISP2 et Bennett sontensemencés avec un inoculum (spores) de l'isolat d'actinomycète provenant de cultures mûres et âgées de huit jours et poussant sur milieu solide ISP2. Les suspensions ainsi obtenues sont homogénéisées au vortex puis les tubes sont incubés à 30°C pendant trois jours.

1.2.- Cinétiques de production

L'évolution de la production des antibiotiques, de la croissance et du pH a été suivie pendant 10 jours. Des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu ISP2 ou Bennett sontensemencées par les pré-cultures (bien homogénéisées au vortex) à raison d'un tube par fiole d'Erlenmeyer. Les cultures sont incubées dans un shaker à 30°C et agitées à 250 rpm. Des prélèvements sont effectués toutes les 24 h pendant 10 jours.

1.2.1.- Suivi de la production d'antibiotiques

La production d'antibiotiques est mesurée par la méthode de diffusion des puits (Aszalos, 1986) contre *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramannianus*. Pour cela, le germe-cible estensemencé dans le milieu ISP2 (contenant 12 g l⁻¹ d'agar) maintenu en surfusion à 45°C, lequel est coulé par la suite dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification du milieu, des puits de 10 mm de diamètre sont réalisés dans le milieu. Chaque puits reçoit 0,2 ml de culture de chaque isolat d'actinomycète prélevés quotidiennement. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles. Elles sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 48 h. Les diamètres autour des disques sont alors mesurés.

1.2.2.- Suivi de l'évolution de la croissance et du pH

La croissance cellulaire est déterminée par la mesure du poids sec de la biomasse, selon la méthode de Pfefferle *et al.* (2000). Deux millilitres de culture sont prélevés toutes les 24

h puis centrifugés à 5000 g dans des tubes Eppendorf préalablement tarés. Le surnageant est récupéré et va servir pour suivre l'évolution du pH du milieu grâce à un pH mètre de marque Hanna. Le culot (biomasse) est lavé par centrifugation à 3 reprises avec de l'eau distillée. Les tubes (contenant le culot sans eau) sont ensuite incubés à 100°C durant 24 h. Le poids sec est obtenu en soustrayant le poids du tube Eppendorff contenant le mycélium sec à celui du tube vide. Le poids sec ainsi déterminé est ensuite rapporté au litre de volume de culture (exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture).

2.- Extraction et mise en évidence des antibiotiques

2.1.- Culture en fioles agitées

Les conditions de culture sont les mêmes que celles qui ont été décrites lors de l'étude des cinétiques de production des antibiotiques.

L'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de culture et du mycélium correspond à la production optimale de ces substances (définie lors des expériences précédentes).

2.2.- Extraction des antibiotiques

2.2.1.- Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture est réalisée à l'aide de quatre solvants organiques non miscibles avec l'eau et de polarité croissante (*n*-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol). Cette expérimentation permettra de sélectionner le meilleur solvant d'extraction pour la suite du travail.

La culture est centrifugée puis filtrée. Cent millilitres du filtrat sont mélangés dans une ampoule à décanter, avec un volume égal de solvant. Les phases organiques et aqueuses sont récupérées séparément, concentrées à sec puis reprises dans un mélange méthanol-dichlorométhane ou eau respectivement et testées par la méthode des disques de papier (antibiographie). Les extraits organiques sont déshydratés 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 résiduelle et les contaminants hydrophiles.

2.2.2.- Extraction à partir du mycélium (Mechlinski, 1978)

Le mycélium est recueilli après filtration des cultures et lavé plusieurs fois à l'eau distillée par centrifugation (3000 g). Le culot mycélien est récupéré dans une fiole d'Erlenmeyer, puis agité dans du méthanol pendant 2 h à température ambiante.

Après filtration sous vide, l'extrait méthanolique est évaporé à sec, puis récupéré dans 1 ml de méthanol. Les activités antibiotiques sont recherchées par la méthode des disques de papier (antibiographie).

3.- Antibiographie

Les extraits organiques obtenus à partir des filtrats de culture et du mycélium ainsi que les phases aqueuses sont testés par antibiographie contre *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramaniannus*.

Des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 50 μ l à 90 μ l (pour les tests antibactériens) et de 70 μ l à 120 μ l (pour les tests antifongiques) d'extraits à tester. Ils sont séchés à 37°C durant 45 min, puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 30 min.

Les disques sont ensuite déposés à la surface du milieu ISP2 semi-solide (12 g l⁻¹ d'agar), préalablement ensemencé avec le germe-cible et coulé en boîtes de Pétri. Celles-ci sont mises à 4°C pendant 2 h, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait après 24 à 48 h et consiste à déterminer le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque. Cette expérience a permis également de choisir le meilleur solvant d'extraction, qui a été retenu pour la suite des travaux.

4.- Mise en évidence des antibiotiques par bioautographie

4.1.- Préparation des plaques de gel de silice

Les plaques de gel de silice sont préparées de la manière suivante:

- 100 ml d'eau distillée sont ajoutés à 40 g de silice G60 (Merck) contenu dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml.
- le gel obtenu après une forte agitation (30 s environ) est étalé uniformément sur des plaques en verre (20 x 20 cm) à l'aide de l'étaioir de Desaga réglé pour une épaisseur de 0,25 mm.
- les plaques sont séchées à 40°C pendant une nuit et régénérées à 105°C durant une heure avant utilisation.

4.2.- Dépôt des échantillons et développement des plaques

Les échantillons sont déposés en surface sous forme de spots à l'aide d'une micro-seringue par fractions de 5 μ l pour arriver à un volume final de:

- extraits de la phase organique: 30 à 50 μ l pour les tests antibactériens et 50 à 80 μ l pour les tests antifongiques.
- extraits méthanoliques du mycélium: 20 à 30 μ l pour les tests antibactériens et 30 à 45 μ l pour les tests antifongiques.

Les plaques sont ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le système de solvant choisi. Les systèmes de solvants utilisés sont:

- acétate d'éthyle-méthanol (A.M): 100/15, en volume.
- *n*-butanol-acide acétique-eau (B.A.E): 60/20/20, en volume.

Après développement, la migration est arrêtée lorsque le front du solvant est distant de 2 cm du bord supérieur de la plaque. Les plaques sont ensuite retirées des cuves et séchées sous hotte toute une nuit, afin d'éliminer toute trace de solvant susceptible d'empêcher la croissance du microorganisme-cible lors de la bioautographie.

Les chromatogrammes obtenus sont observés à l'œil nu puis sous UV afin de délimiter les taches présentant une absorbance à 254 nm ou une fluorescence à 365 nm.

4.3.- Bioautographie

Les composés actifs sont révélés par bioautographie; leur nombre et leur Rf (rapport frontal) sont ainsi déterminés. La méthode utilisée est celle de Betina (1973).

Les chromatogrammes sont déposés sur un support en verre placé dans des boîtes en polyéthylène (22 x 24 cm), dont le fond est tapissé d'une feuille de papier filtre imbibée d'eau stérile qui maintient une atmosphère humide et permet de retarder la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est ensuite stérilisé durant 45 min sous UV à 254 nm.

Un volume de 50 ml de gélose molle (7 g l^{-1} d'agar) d'ISP2 en surfusion (45 à 50°C) est inoculé avec 2 ml d'une suspension de germe-cible (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramaniannus*). Ce milieu est uniformément réparti sur toute la surface de la plaque. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans le milieu puis incubées à 30°C. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 à 48 h et les Rf sont également calculés.

5.- Etude de la stabilité des antibiotiques

Il est intéressant de connaître la stabilité des produits actifs vis-à-vis de certains paramètres tels le pH, la température, la lumière et la durée de conservation. Cette étude est menée sur des surnageants de culture stérilisés par filtration et sur des extraits (bruts et semi-purifiés) stérilisés sous UV à 254 nm. L'activité des échantillons traités a été déterminée par la technique des puits (filtrats de culture) et par la méthode de diffusion des disques de papier (extraits secs) vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus*.

5.1.- Stabilité en fonction du pH

Des fractions de 5 ml de filtrat de culture sont ajustées à différents pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12) avec du NaOH et du HCl (0,1 N et 1N). Les tubes sont laissés 24 h à 20°C. Les pH sont ensuite ramenés à la neutralité et les échantillons traités sont testés par la technique des puits.

5.2.- Stabilité en fonction de la température

Des fractions de 5 ml de filtrat sont soumises aux traitements thermiques suivants: 50°C durant 60 min, 70°C durant 30 min, 100°C durant 15 min et autoclavage à 120°C pendant 10 min. les échantillons sont refroidis à température ambiante et testés par la technique des puits.

5.3.- Stabilité à la lumière

Des tubes contenant des filtrats de culture et en parallèle d'autres contenant des extraits bruts sont exposés à l'action d'une lampe (100 Watts) placée à une hauteur de 50 cm. Après 24 h d'exposition, l'activité est testée et comparée à celles des témoins, l'un conservé à l'obscurité et l'autre à la lumière du jour.

5.4.- Stabilité en fonction de la durée de conservation

Des extraits semi-purifiés (contenus dans des tubes) et conservés à - 32°C pendant différentes périodes (1, 2, 3 et 4 années) sont testés et l'activité est comparée à un témoin (extraction réalisée au cours de la semaine de l'expérimentation).

6.- Purification des antibiotiques

Des cultures ont été réalisées sur milieu ISP2 en fioles d'Erlenmeyers pendant 8 jours d'incubation à 30°C à 250 rpm (au total 7 litres ont été produits). Les extractions ont été effectuées avec le meilleur solvant d'extraction.

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

Les techniques analytiques utilisées précédemment (paragraphe 4.1 et 4.2) ont été transférées en techniques préparatives afin d'obtenir des quantités appréciables d'antibiotiques semi-pures pour des études ultérieures.

Des plaques de gel de silice G60 (20 x 20 cm), de 0,5 mm d'épaisseur sont préparées avec 50 g de gel et 120 ml d'eau distillée. Après séchage et régénération des plaques, 450 µl d'extrait concentré sont déposés à l'aide d'une micro-seringue en une bande mince et continue. Les plaques sont ensuite développées avec le meilleur système de solvant ayant donné une bonne séparation de l'extrait. Une bioautographie est parallèlement réalisée pour localiser avec précision les bandes actives, qui sont alors grattées. Les antibiotiques sont désorbés dans 200 ml de méthanol sous agitation magnétique pendant 1 à 2 h (température ambiante), puis filtré sur verre fritté n° 4. Le filtrat est concentré à sec, puis conservé à - 32°C pour pouvoir par la suite procéder à la purification finale des antibiotiques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

6.2.- Purification des antibiotiques par HPLC

L'HPLC a été utilisée pour la purification finale des antibiotiques. Nous avons utilisé un appareil de marque Waters, équipé des éléments suivants:

- Injecteur de type Rhéodine 7725i relié à une boucle d'injection de 500 µl.
- Contrôleur: type Waters 600 controller.
- Système de pompe: type Waters 60F.
- Détecteur UV-Visible: dual bande type Waters 2487.
- Colonne semi-préparative Waters XBridge C18,5 µm (granulométrie), 10 x 200mm(diamètre et longueur respectivement).
- Pré-colonne Waters XBridge C18, 5 µm, 10 x 10 mm.
- Logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données: Empower 2.

La phase mobile est un mélange de méthanol-eau (préalablement filtrés et dégazés) en gradient continu (30 à 100%) pendant 40 min. le débit de l'éluant est de 1,5 ml/min. la détection se fait à 220 et 261 nm.

Ces conditions de purification ont été déterminées après plusieurs expériences préliminaires.

L'extrait semi-purifié par chromatographie sur plaques épaisses est solubilisé dans un mélange méthanol-dichlorométhane, ultrafiltré (filtre de 0,2 µm de porosité), puis 50 à 150 µl sont injectés. Les différentes fractions obtenues sont récupérées séparément puis concentrées sous air comprimé. Elles sont ensuite testées par antibiographie afin de localiser les fractions actives.

La purification finale des antibiotiques est obtenue après trois réinjections.

7.- Etudes physico-chimiques et spectroscopiques des antibiotiques

7.1.- Révélation chimique des antibiotiques

Parallèlement aux bioautographies, des révélations chimiques sont réalisées sur des plaques de gel de silice (CCM) (mêmes conditions de migration), afin de pouvoir effectuer des corrélations aux même Rf, entre activité biologique et révélation chimique.

Les révélateurs utilisés (Merck, 1975) sont les suivants: la ninhydrine(révéléateur des fonctions amines), le naphtorésorcinol-H₂SO₄(révéléateur des glucides), l'anisaldéhyde-H₂SO₄(révéléateur des glucides, des stéroïdes et des terpènes), le chlorure de fer ferrique (révéléateur des phénols) et le formaldéhyde-H₂SO₄(révéléateur des composés aromatiques polycycliques).

Les taches colorées peuvent apparaître à froid ou à chaud (5 min à 100°C).Les méthodes détaillées sont données en annexe2.

7.2.- Spectroscopie UV- visible

Cette étude vise à avoir une première idée sur les produits obtenus en permettant de détecter les composés aromatiques et les systèmes insaturés et conjugués.

Les spectres UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Shimadzu 260 entre 200 et 500 nm pour les produits semi-purifiés et complètement purifiés.

7.3.- Spectroscopie Infrarouge

Elle permet de déterminer certains groupements fonctionnels qui apparaissent sous forme de bandes d'absorption dans l'infrarouge (Williams et Fleming, 1989).

La méthode utilisée est celle de la pastille de bromure de potassium (KBr). A cet effet, 1 mg d'antibiotique sec est broyé dans un mortier d'Agathe avec 100 mg de KBr (qui n'absorbe pas dans l'infrarouge). Le mélange homogène est placé dans un dispositif spécial permettant la réalisation d'une pastille circulaire translucide sous haute pression pendant 4 à 5 min. La pastille est placée dans un spectrophotomètre à infrarouge (Shimadzu IR 470) où elle est traversée par le flux lumineux entre 400 et 4000 cm⁻¹.

7.4.- Spectrométrie de masse

Les masses moléculaires des antibiotiques purs sont déterminées par la technique de « Nano-Electrospray Ionisation » (Nano-ESI-IT-MS), en utilisant un spectromètre LCQ ion-trap (Finnigan MAT, San José, CA). La masse moléculaire à haute résolution (HREIMS)est déterminée en utilisant un GCT Premier System.

Cette technique 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. Celle à haute résolution, fournit en plus la formule chimique élémentaire.

Pour la Nano-ESI-MS, l'analyse est réalisée en mode positif et en mode négatif. Le programme d'analyse utilisé est Xcalibur 1.2 de Thermo-Quest (San Jose, USA).

La masse à haute résolution a été déterminée en mode positif. Le programme d'analyse utilisé est:

· Tolérance = 5.0 PPM/DBE: min = -1.5, max = 50.0.

- Isotope cluster parameters: séparation = 1.0, abondance = 1.0%.

7.5.- Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton et du carbone 13

Les études RMN ont été réalisées avec un spectromètre Bruker Avance 500 équipé d'une sonde à Z-gradient inverse à triple résonance de 5 mm (^1H TBI, 31P, BB). Les échantillons (3 mg) ont été solubilisés dans 600 μl de chloroforme deutérié CD_3OD . La température est fixée à 298K. Les signaux du proton ^1H et du carbone ^{13}C ont été attribués en fonction des déplacements chimiques des protons ^1H et des carbones ^{13}C , des constantes de couplages spin-spin, des profils "splitting patterns" et de l'intensité des signaux, ainsi que par les analyses de corrélations ^1H - ^1H COSY45, ^1H - ^{13}C HSQC et ^1H - ^{13}C HMBC.

8.- Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI)

La détermination des CMI est réalisée par la méthode de diffusion dans l'agar selon Oki *et al.* (1990). Une série de dilutions de chaque antibiotique (0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 75 et 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) est incorporée dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive.

Les germes-cibles (bactéries, champignons et levures) sontensemencés par point (en double) en déposant 2 μl de la suspension de chaque germe-cible (préalablement calibré à 10^6 UFC ml^{-1}) à la surface du milieu.

La lecture est effectuée à 30°C, après 24 et 48 h d'incubation pour les bactéries et après 48 et 72 h d'incubation pour les champignons et consiste à évaluer la croissance des germes utilisés par rapport au témoin sans antibiotiques. Les CMI sont déterminées en considérant les concentrations minimales qui inhibent totalement la croissance des germes.

PARTIE III RESULTATS ET DISCUSSION

I.- ETUDE TAXONOMIQUE DES ACTINOMYCETES

1.- Détermination du genre

La détermination du genre des isolats SA198, SA181 et SA152 est effectuée sur la base des critères morphologiques et chimiques (analyse des constituants cellulaires).

1.1.- Caractéristiques morphologiques

1.1.1.- Caractéristiques culturales

Les isolats SA198, SA181 et SA152 possèdent une très bonne croissance sur les milieux ISP2, ISP3, ISP4 (modérée pour SA181) et Bennett. La croissance est faible pour les trois isolats sur milieu TSA et variable (faible, modérée ou bonne) sur milieu GN. La sporulation est meilleure sur ISP2, ISP4 et Bennett (tableau 7).

L'isolat SA198 produit un mycélium aérien (MA) blanc jaunâtre, un mycélium du substrat (MS) brun rougeâtre, brun jaunâtre, brun ou jaune vif selon les milieux et ne produit pas de pigments solubles.

L'isolat SA181 produit un MA gris bleuté, brun rosâtre ou blanc jaunâtre, un MS brun jaunâtre, brun foncé ou jaune et pas de pigments solubles.

L'isolat SA152 produit un MA blanc bleuté à gris bleuté clair, un MS brun, brun jaunâtre, bleu ou gris selon les milieux, et des pigments solubles de couleur bleu sur ISP2 et ISP4 et brun rougeâtre sur gélose nutritive.

Les pigments mélanoides ne sont produits que par l'isolat SA198, sur milieu de culture ISP7 et pas sur milieu ISP6 (ces deux milieux étant conçus spécialement pour la production de ces pigments).

1.1.2.- Caractéristiques micromorphologiques

Les trois isolats d'actinomycètes présentent exactement les mêmes caractéristiques micromorphologiques suggérant ainsi la présence d'un même genre.

Ces isolats présentent un MA à filaments ramifiés qui se fragmentent totalement, et de manière anarchique (souvent en zig-zag), en de longues chaînes de spores en bâtonnets ou ovoïdes et non mobiles (figure 5). Le MS se fragmente assez peu pour les isolats SA198 et SA152 et abondamment pour SA181.

Nouvelles espèces de Saccharothrix isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrétés par Saccharothrix SP. SA198

Souches	SA198	SA181	SA152
ISP2			
Cr	+++	+++	+++
MA	+++ Blanc jaunâtre	+++ Gris bleuté vif	+++ Blanc bleuté
MS	Brun rougeâtre foncé	Brun jaunâtre sombre	Brun foncé
PS	-	-	++ Bleu foncé
ISP3			
Cr	+++	+++	+++
MA	+++ Blanc jaunâtre	-	++ Gris bleuté clair
MS	Brun jaunâtre foncé	Brun foncé	Brun jaunâtre foncé
PS	-	-	-
ISP4			
Cr	+++	++	+++
MA	++ Blanc jaunâtre	-	-
MS	Brun clair	Brun jaunâtre	Bleu foncé
PS	-	-	++ Bleu foncé
Bennett			
Cr	+++	+++	+++
MA	++ Blanc jaunâtre	+++ Brun rosâtre	+ Blanc
MS	Brun jaunâtre foncé	Brun	Gris
PS	-	-	-
TSA			
Cr	+	+	+
MA	-	-	-
MS	Jaune vif	Jaune vif	Brun jaunâtre
PS	-	-	-
GN			
Cr	++	+++	+
MA	-	++ Blanc jaunâtre	+ Blanc bleuté
MS	Brun jaunâtre clair	Jaune pale	Brun
PS	-	-	++ Brun rougeâtre vif

Note: **Cr**, croissance; **MA**, mycélium aérien; **MS**, mycélium du substrat; **PS**, pigment soluble.
 +++, abondant; ++, modéré; +, faible; -, inexistant.

Tableau 7. Caractéristiques macromorphologiques des isolats SA198, SA181 et SA152.

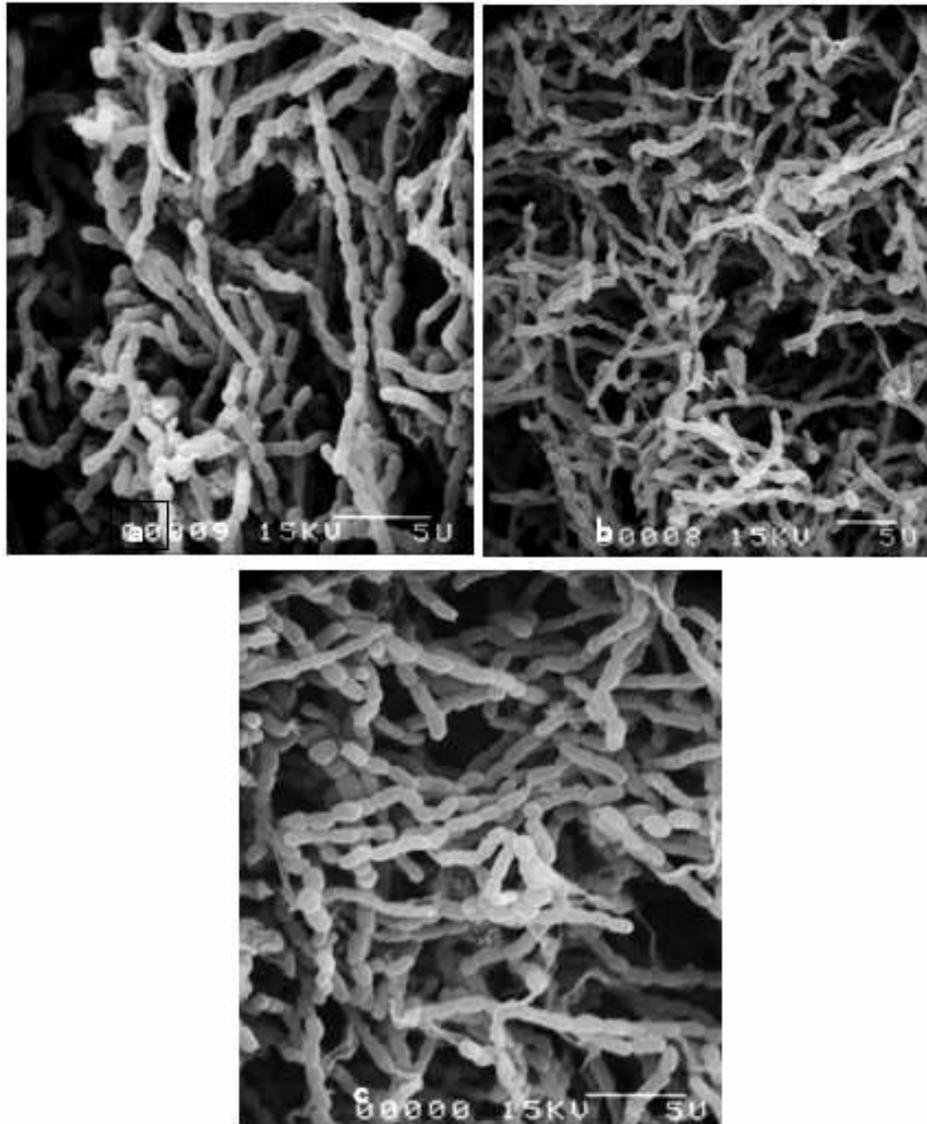


Figure 5. Micromorphologie en microscopie électronique à balayage des isolats SA152 (a), SA181 (b) et SA198 (c) cultivés pendant une semaine à 30°C sur milieu ISP2. Bar = 5 µm.

1.2.- Caractéristiques chimiques

1.2.1.- Composition en acides aminés, en sucres et en phospholipides

Les isolats SA198, SA181 et SA152 possèdent la même composition en acides aminés, en sucres et en phospholipides, ce qui confirme leur appartenance à un même genre.

En effet, les trois isolats possèdent dans leur paroi l'isomère *méso* (ou DL) de l'acide diaminopimélique, mais sans glycine. Les sucres cellulaires présents sont le rhamnose, le galactose, le mannose et le ribose. Les phospholipides membranaires détectés sont la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylméthyléthanolamine, le diphosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol et les phosphatidylinositol mannosides. Le phospholipide taxonomiquement important est dans ce cas la phosphatidyléthanolamine.

1.2.2.- Composition en ménaquinones

Les ménaquinones ont été analysées uniquement pour les isolats SA181 et SA152.

Pour l'isolat SA181, les ménaquinones prédominantes sont MK-9(H4) (55%), MK-7(H4) (12%), MK-10(H4) (9%) et à un degré moindre MK-10(H0) (3%) et MK-11(H4) (2%), avec des traces de MK-9(H0), MK-9(H2), MK-9(H6) et MK-10(H2).

Pour l'isolat SA152, les ménaquinones prédominantes sont MK-9(H4) (62%), MK-7(H4) (17%) et MK-10(H4) (6%), avec des traces de MK-9(H0) et MK-9(H2).

Les deux isolats sont donc caractérisés par une dominance très nette de MK-9(H4) (55-62%).

1.2.3.- Composition en acides gras

Les acides gras ont été analysés uniquement pour les isolats SA181 et SA152 (tableau 8).

Pour l'isolat SA181, ce sont les acides gras iso-C_{16:0} (27,0%) et iso-C_{15:0} (14,9%) qui prédominent. Toutefois, on note la présence de l'iso-C_{17:1w9}, (9,8%), le 9-méthyl-C_{16:0} (9,5%), l'antéiso-C_{17:0} (9,4%) et l'iso-C_{16:1 H} (6,8%). Les autres sont inférieurs à 6%.

Pour l'isolat SA152, ce sont les acides gras suivants qui prédominent: iso-C_{16:0} (36,1%) et iso-C_{15:0} (13,6%). D'autres acides gras sont également notés, tels que C_{17:1 w6-cis} (8,3%) et iso-C_{16:1 H} (8,0%). Les autres sont inférieurs à 5%.

Pour les deux isolats, il y a donc une dominance nette d'acides gras à chaînes ramifiées du type iso-C_{16:0} et iso-C_{15:0}.

Acides gras	Isolats	
	SA181	SA152
Iso-13:0	0,08	0,19
Iso-14:0	1,34	2,90
Iso-15:1 G	1,54	1,28
Antéiso A-15:1	0,12	0,25
Iso-15:0	14,87	13,56
Antéiso-15:0	4,03	4,37
15:1 w-6	-	0,74
15:0	0,12	-
Iso-16:1 H	6,81	8,01
Iso-16:0	27,00	36,14
Antéiso-16:0	0,28	0,28
16:0	0,27	1,29
9 méthyl-16:0	9,45	-
Antéiso-17:1 w-9	-	0,92
Iso-17:0	3,99	2,13
Antéiso-17:0	9,38	4,49
17:1-9cis	3,72	-
Iso-2-hydroxy-16:0	5,80	-
17:1 w-8	-	4,64
17:1 w-6	-	8,34
17:0	0,38	0,98
Iso-2-hydroxy-17:0		
10 méthyl-17:0	1,03	0,84
Antéiso-2-hydroxy-17:0	0,24	-
Iso-18:0	1,22	0,57
18:1-9Cis	0,46	-

Tableau 8. Profil des acides gras des isolats SA181 et SA152.

Note : les pourcentages sont donnés par rapport au total des acides gras.

Valeurs en gras: pourcentages des acides gras prédominants.

1.3.- Identification du genre

L'identification du genre est effectuée grâce à la combinaison des critères morphologiques et chimiques.

Les isolats SA198, SA181 et SA152 possèdent un mycélium aérien qui se fragmente de manière anarchique en de longues chaînes de spores (souvent en zig-zag) et un mycélium du substrat fragmenté.

L'acide diaminopimélique est présent dans leur paroi sous forme DL (*méso*), tandis que la glycine est absente. Les sucres cellulaires taxonomiquement importants sont le rhamnose et le galactose. Ceci indique la présence du chimiotype III E (Labeda et

Kroppensted, 2000) chez ces isolats. Le phospholipide membranaire diagnostique est la phosphatidyléthanolamine, soit le type PII selon Lechevalier *et al.* (1977).

Ces caractéristiques morphologiques et chimiques permettent de rattacher les isolats SA198, SA181 et SA152 au genre *Saccharothrix* (Labeda *et al.*, 1984).

De plus, les isolats SA181 et SA152 sont riches en acides gras à chaînes ramifiées, surtout iso-C_{16:0} et iso-C_{15:0}, et une dominance très nette des ménaquinones de type MK-9(H4). Ceci correspond bien également aux caractéristiques du genre *Saccharothrix*.

2.-Détermination des espèces

La détermination des espèces appartenant au genre *Saccharothrix* est basée sur les caractéristiques physiologiques et moléculaires.

2.1.- Caractéristiques physiologiques

Les caractéristiques physiologiques des isolats de *Saccharothrix*, basées sur 55 tests, sont consignées dans le tableau n° 9.

Ces résultats montrent que, sur l'ensemble des 55 tests étudiés, 34 sont positifs contre 21 négatifs pour l'isolat SA152, 32 positifs contre 23 négatifs pour l'isolat SA181 et seulement 21 positifs contre 34 négatifs pour l'isolat SA198.

Les trois isolats dégradent la caséine, l'esculine, la gélatine, l'hypoxanthine et la tyrosine, utilisent le cellobiose, le fructose, le glucose, le ribose, l'acétate, le propionate, le pyruvate et le succinate comme source de carbone, ainsi que la proline comme source d'azote, et résistent tous les trois à la novobiocine. Cependant, aucun des trois isolats n'hydrolyse la guanine, la testostérone et la xanthine et n'utilise l'adonitol, le lactose, le benzoate, le citrate, l'oxalate et le tartrate comme source de carbone, ou encore la sérine comme source d'azote, et aucune croissance n'est décelée à pH 5.

Les isolats SA152, SA181 et SA198 montrent une très bonne croissance à 37°C. Par ailleurs, les isolats SA152 et SA181 montrent également une très bonne croissance à 45°C et les isolats SA181 et SA198 à pH 9.

Les trois isolats se distinguent entre eux par un certain nombre de caractères.

En effet, l'isolat SA152 est le seul isolat, parmi les trois *Saccharothrix*, qui dégrade l'adénine et l'arbutine, utilise l'inositol, le mannitol, le mannose, le mélézitose, le raffinose, la salicine et le tréhalose comme source de carbone, mais pas le saccharose, et possède une nitrate réductase.

L'isolat SA181 se distingue des deux autres *Saccharothrix* par l'utilisation du mélibiose, du sorbitol et du butyrate comme source de carbone.

En revanche, l'isolat SA198 diffère des isolats SA152 et SA181 par l'utilisation de l'alanine comme seule source d'azote et la production de pigments mélanoides sur ISP7, par la non utilisation de l'amidon, de l'arabinose, du galactose, du glycérol, du maltose et du rhamnose, et par l'absence de croissance à 45°C.

Les différences macromorphologiques et physiologiques importantes observées entre les isolats de *Saccharothrix* suggèrent fortement la présence de trois espèces distinctes.

2.2.- Caractéristiques moléculaires

2.2.1.- Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et phylogénie

Les séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S des isolats SA152, SA181 et SA198 ont été déposées au niveau de la banque de gènes GenBank sous le numéro d'accèsion FJ 379333, HQ 399564 et JN 036396, respectivement.

Les résultats du séquençage ont montré que les trois isolats appartiennent bien au genre *Saccharothrix* comme cela a déjà été constaté lors des études morphologiques et chimiques.

2.2.1.1.- Isolot SA152

L'alignement de la séquence de l'isolat SA152 (1506 paires de bases) par le blast a montré des pourcentages de similitude allant de 97,3 à 99,3% avec les espèces de ce genre, *S. xinjiangensis* NBRC 101911^T (AB381939) (Hu *et al.*, 2004) et *S. texasensis* NRRL B-16107^T (AF114815) (Labeda et Lyons, 1989) étant les espèces les plus proches, avec 99,3 et 98,9% de similarité respectivement (tableau 10).

La figure 6, illustrant la phylogénie de l'isolat SA152 basée sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S montre effectivement que cet isolat est plus proche de *S. xinjiangensis* et *S. texasensis* par rapport aux autres espèces de *Saccharothrix*.

2.2.1.2.- Isolot SA181

La séquence d'ADN de 1505 paires de bases codant pour l'ARNr 16S déterminée pour l'isolat SA181, alignée avec les séquences des espèces du genre, a montré des taux de similarité allant de 97 à 99,0%, *S. longispora* NRRL B-116116^T (AF114809) (Grund et Kroppenstedt, 1989), *S. yanglingensis* Hhs.015^T (GQ284639) (Yan *et al.*, 2012) et *S. xinjiangensis* NBRC 101911^T (AB381939) (Hu *et al.*, 2004) étant les espèces les moins différentes, avec 99,0, 98,9 et 98,4% de similarité respectivement (tableau 10).

L'analyse phylogénétique (figure 6) montre la position taxonomique de l'isolat SA181 qui se rapproche effectivement de ces trois espèces, mais qui se détache des autres.

2.2.1.3.- Isolot SA198

L'isolat SA198 présente une séquence de 1368 paires de bases du gène codant pour l'ARNr 16S. Après alignement de cette séquence par le blast avec les espèces du genre *Saccharothrix*, des taux de 97,2 à 98,8% de similarité ont été obtenus, les pourcentages les plus élevés étant observés avec *S. australiensis* NRRL 11239^T (AF114803) (Labeda *et al.*, 1984) et *S. algeriensis* NRRL B-24137^T (AY054972) (Zitouni *et al.*, 2004a), avec 98,8 et 98,6% de similarité respectivement (tableau 10).

La phylogénie de l'isolat SA198, illustrée par la figure 6, montre que ce dernier se détache nettement des espèces *S. australiensis* et *S. algeriensis*, espèces avec lesquelles il forme un cluster.

La figure 6 montre clairement la position taxonomique des isolats SA152, SA181 et SA198 qui forment des lignées distinctes, et qui se détachent nettement entre eux et de toutes les espèces du genre *Saccharothrix*, suggérant ainsi la présence de trois nouvelles espèces.

2.2.2- Hybridation ADN-ADN

Cette étude n'a été réalisée que pour les isolats SA152 et SA181. Une hybridation (réalisée en double) a été effectuée pour chacun d'eux avec les espèces les plus proches phylogénétiquement.

Tests	Isolats			Tests	Isolats		
	SA152	SA181	SA198		SA152	SA181	SA198
Dégradation				Xylose	+	+	-
Adénine	+	-	-				
Arbutine	+	-	-	Production de pigments mélanoides	-	-	+
Caséine	+	+	+				
Esculine	+	+	+	Nitrate réductase	+	-	-
Gélatine	+	+	+				
Guanine	-	-	-	Décarboxylation des acides organiques			
Amidon	+	+	-				
Testostérone	-	-	-	Acétate	+	+	+
Tween 80	-	+	+	Benzoate	-	-	-
Tyrosine	+	+	+	Butyrate	-	+	-
Xanthine	-	-	-	Citrate	-	-	-
Hypoxanthine	+	+	+	Oxalate	-	-	-
				Propionate	+	+	+
Utilisation des glucides				Pyruvate	+	+	+
Adonitol	-	-	-	Succinate	+	+	+
Arabinose	+	+	-	Tartrate	-	-	-
Cellobiose	+	+	+				
Fructose	+	+	+	Utilisation des acides aminés			
Galactose	+	+	-	Alanine	-	-	+
Glucose	+	+	+	Proline	+	+	+
Glycérol	+	+	-	Sérine	-	-	-
Inositol	+	-	-				
Lactose	-	-	-	Résistance aux antibiotiques (µg/ml)			
Maltose	+	+	-	Chloramphénicol (30)	-	+	-
Mannitol	+	-	-	Erythromycine (15)	-	+	-
Mannose	+	-	-	Novobiocine (5)	+	+	+
Mélézitose	+	-	-				
Mélibiose	-	+	-	Croissance à:			
Raffinose	+	-	-	37°C	+	+	+
Rhamnose	+	+	-	45°C	+	+	-
Ribose	+	+	+	pH 5	-	-	-
Saccharose	-	+	+	pH 9	-	+	+
Salicine	+	-	-				
Sorbitol	-	+	-				
Tréhalose	+	-	-				

Tableau 9. Caractéristiques physiologiques des isolats de *Saccharothrix*.

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

2.2.2.1.- Isolats SA181

L'ADN de la souche SA181 a été hybridé avec celui de *S. longispora* DSM 43749^T, *S. texasensis* DSM 44231^T et *S. xinjiangensis* DSM 44896^T, espèces les plus proches phylogénétiquement. L'hybridation n'a pas été faite avec *S. yanglingensis* Hhs.015^T dont le nom n'a pas encore été validé par le code bactériologique dans la revue *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Les pourcentages de similarité moyens avec

les trois premières espèces citées sont respectivement de 16,05% (14,7 et 17,4%), 50,05% (46,5 et 53,6%) et 22,0% (24,2 et 19,8%). Ces taux sont nettement inférieurs à 70%, limite proposée par Wayne *et al.* (1987) pour différencier les espèces entre elles.

Ces résultats nous conduisent à conclure que la souche SA181 est une nouvelle espèce de *Saccharothrix* et le nom de *S. hoggarensis* lui a ainsi été attribué (Boubetra *et al.*, 2012).

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche SA181 a été déposée dans la banque des gènes GenBank sous le numéro d'accèsion HQ399564. La souche, quant à elle, a été déposée dans deux collections mondiales, la DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7B, Braunschweig, Allemagne) sous le numéro DSM 45457^T, et la CCUG ([Culture Collection, University of Göteborg, Suède](#)) sous le numéro 60214^T. Elle constitue la souche-type de *S. hoggarensis*.

2.2.2.2.- Isolat SA152

Pour l'isolat SA152, l'hybridation ADN-ADN a été réalisée avec les espèces les plus proches, qui sont *S. xinjiangensis* DSM 44896^T et *S. texasensis* DSM 44231^T. Les résultats ont montré que cet isolat possède seulement 16,2% (13,9 et 18,5%) de parenté avec l'espèce *S. xinjiangensis* et 33,9% (36,2 et 31,6%) avec *S. texasensis*. Ces deux valeurs sont nettement inférieures à la limite de 70% proposée par Wayne *et al.* (1987) pour différencier deux espèces distinctes.

Ces données permettent de conclure que la souche SA152 représente une nouvelle espèce du genre *Saccharothrix*, pour laquelle le nom *Saccharothrix saharensis* a été proposé.

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche SA152 a été déposée dans la banque des gènes GenBank sous le numéro d'accèsion FJ 379333. La souche, quant à elle, a été déposée dans la collection DSMZ sous le numéro DSM 45456^T, et la collection CCUG sous le numéro 60213^T. Elle constitue la souche-type de *S. saharensis*.

Espèces	Souche-type	Numéro de la séquence	Pourcentage de similarité		
			SA152	SA181	SA198
<i>Saccharothrix algeriensis</i>	NRRL B-24137 [†]	AY054972	98,1	97,4	98,6
<i>S. australiensis</i>	NRRL-11239 [†]	AF114803	98,6	97,7	98,8
<i>S. coeruleofusca</i>	NRRLB-6115T [†]	AF114805	98,4	97,8	98,3
<i>S. espanaensis</i>	NRRL 15764 [†]	AF114807	97,8	97,2	98,2
<i>S. longispora</i>	NRRL B-116116 [†]	AF114809	98,3	99,0	98,4
<i>S. mutabilis</i> subsp. capreolus	DSM 40225 [†]	X76965	97,6	96,7	97,8
<i>S. mutabilis</i> subsp. mutabilis	DSM-43853 [†]	X76966	97,8	96,9	98,0
<i>S. syringae</i>	NRRL B-16468 [†]	AF114812	98,4	97,8	98,4
<i>S. texasensis</i>	NRRL B-16107 [†]	AF114815	98,9	98,2	97,2
<i>S. variisporea</i>	NRRL B-16296 [†]	GQ917213	98,3	97,5	98,4
<i>S. violaceirubra</i>	NBRC 102064 [†]	AB284261	97,3	97,0	97,7
<i>S. xijiangensis</i>	NBRC 101911 [†]	AB381939	99,3	98,4	98,7
<i>S. yanglingensis</i>	Hhs.015 [†]	GQ284639	98,4	98,9	98,6

Tableau 10. Résultat du blast des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des isolats SA152, SA181 et SA198 avec les souches-types des espèces du genre *Saccharothrix*.

Note: En gras, pourcentages de similarité des espèces les plus proches de chacun des trois isolats.

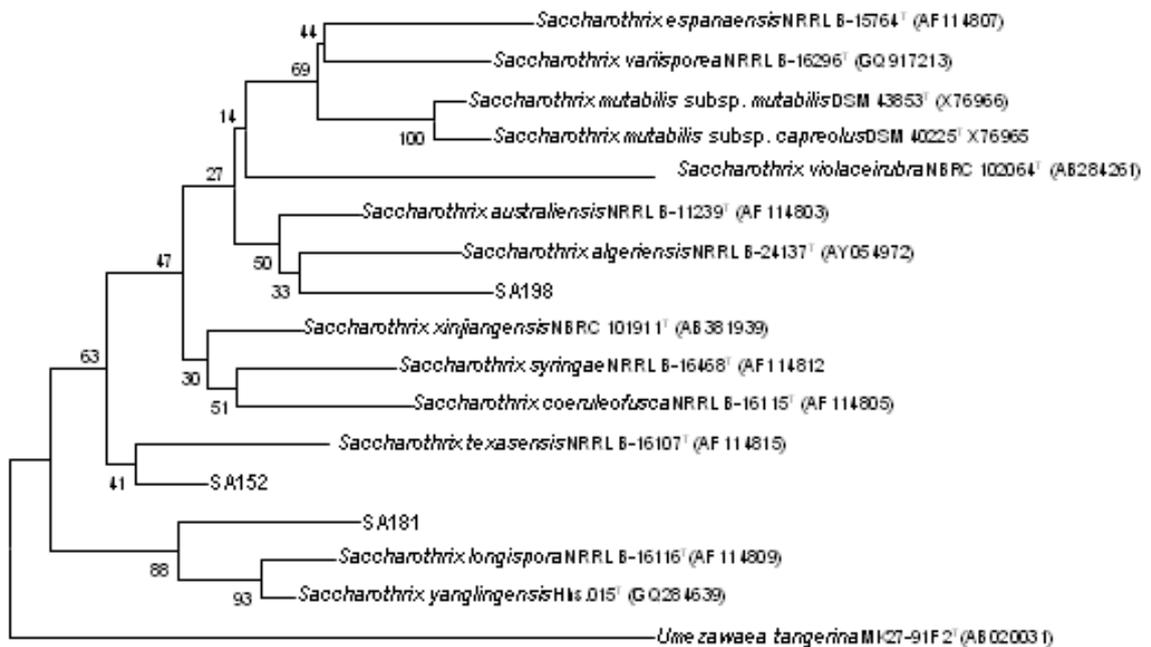


Figure 6. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S et montrant les relations entre les isolats SA181, SA152 et SA198 et les souches-types du genre *Saccharothrix*.

Les nombres au niveau des noeuds indiquent les pourcentages du support «bootstrap» effectués par la méthode du «neighbor-joining».

Les numéros des séquences des souches sont donnés entre parenthèses.

Bar: 0,005 substitution par position de nucléotide.

Umezawaea tangerina est donnée comme "outgroup".

2.3.- Description de nouvelles espèces de *Saccharothrix* (souches SA181 et SA152)

La souche SA181 a été rapprochée phylogéniquement de *Saccharothrix longispora* DSM 43749^T (Grund et Kroppenstedt, 1989), *S. texasensis* NRRL B-16107^T (Labeda et Lyons, 1989) et *S. xinjiangensis* NBRC 101911^T (Hu *et al.*, 2004), ainsi que de l'espèce nouvellement décrite mais dont le nom n'a pas encore été validé, *S. yanglingensis* Hhs.015^T (Yan *et al.*, 2012). L'hybridation ADN-ADN avec les trois premières espèces citées a montré des similarités inférieures à 70%, ce qui suppose, comme l'ont souligné Wayne *et al.* (1987), que la souche SA181 est une espèce distincte génotypiquement.

La souche SA181 se distingue phénotypiquement de ces espèces par les caractéristiques et tests suivants:

- Avec *S. longispora*: adénine, hypoxanthine, butyrate, citrate, lactose, mannitol, mélibiose, salicine, sorbitol, nitrate réductase, croissance à 45°C et croissance en présence de 4 et 5% de NaCl.
- Avec *S. texasensis*: couleur des mycéliums aérien et du substrat, inositol, lactose, mannitol, α méthyl-D-glucoside, raffinose, sorbitol, nitrate réductase et croissance à 45°C.

- Avec *S. xinjiangensis*: couleur des mycélium aérien et du substrat, butyrate, inositol, lactose, mannitol, α méthyl-D-glucoside, raffinose, sorbitol, nitrate réductase, croissance à 45°C et croissance en présence de 4 et 5% de NaCl.
- Les différences avec la nouvelle espèce décrite en 2012 et dont le nom n'a pas encore été validé, *S. yanglingensis*, sont encore plus importantes. Elles concernent:

Couleur des mycélium aérien et du substrat et production de pigments diffusibles, hypoxanthine, gélatine, tyrosine, arabinose, lactose, mélibiose, rhamnose, sorbitol, xylose, nitrate réductase, croissance à pH 5, croissance à 45°C et croissance en présence de 4 et 5% de NaCl.

La souche SA152 a quant à elle été rapprochée phylogénétiquement de *Saccharothrix texasensis* NRRL B-16107^T (Labeda et Lyons, 1989) et *S. xinjiangensis* NBRC 101911^T (Hu et al., 2004), mais l'hybridation ADN-ADN a montré que c'est une espèce à part.

Les différences phénotypiques avec ces espèces concernent les caractéristiques et tests suivants:

- Avec *S. texasensis*: couleur des mycélium aérien et du substrat et production de pigments diffusibles, adénine, butyrate, lactose, mélibiose, salicine, croissance à 45°C et en présence de 4 et 5% de NaCl.
- Avec *S. xinjiangensis*: couleur des mycélium aérien et du substrat et production de pigments diffusibles, adénine, tyrosine, lactose, mélibiose et salicine.

2.3.1.- Description de *Saccharothrix hoggarensis* SA181sp. nov.

Saccharothrix hoggarensis (ho.ggar.en'sis. N.L. fem. adj. *hoggarensis*, se rapportant au Hoggar, sol à partir duquel la souche a été isolée).

La souche SA181 est un actinomycète filamenteux, à Gram-positif, aérobic strict.

Le mycélium aérien est bleu grisâtre sur milieu ISP2, brun rosâtre sur milieu Bennett et blanc jaunâtre sur gélose nutritive. Le mycélium du substrat est brun sur ISP3 et Bennett, brun jaunâtre sur ISP2 et ISP4 et jaune sur gélose nutritive. Les pigments diffusibles et les pigments mélanoides ne sont pas produits.

Le mycélium aérien se fragmente massivement et de manière anarchique en chaînes de spores sous forme de bâtonnets (0,8 à 1 μ m x 1 à 1,5 μ m) non mobiles. Le mycélium du substrat se fragmente abondamment.

Une croissance optimale est observée à 30°C et à pH 7. La croissance a lieu à 20, 37 et 45°C (mais pas à 10°C), et se produit à un pH de 6, 8 et 9 (mais pas à pH 5 et 11).

L'esculine, la caséine, la gélatine, l'hypoxanthine, le Tween 80, l'amidon, la tyrosine et l'urée sont dégradés. L'adénine, l'arbutine, la testostérone et la xanthine ne sont pas dégradées.

La souche SA181 utilise le L-arabinose, le D-cellobiose, le D-fructose, le D-galactose, le D-glucose, le glycérol, le maltose, le mélibiose, le D-ribose, le L-rhamnose, le D-sorbitol, le saccharose, le D-xylose, l'acétate, le butyrate, le lactate, le propionate, le pyruvate et le succinate comme sources de carbone, mais pas l'adonitol, le D-lactose, le D-mannitol, le D-mélézitose, le *méso*-inositol, le D-mannose, l' α méthyl-D-glucoside, le D-raffinose, la salicine, le D-tréhalose, le benzoate, le citrate, l'oxalate et le tartrate.

La L-proline est utilisée comme source d'azote, mais pas la L-alanine et la L-sérine. La nitrate réductase n'est pas produite. La croissance a lieu en présence de NaCl à 4 et 5%, mais pas à 7% (w/v).

En outre, la croissance a lieu en présence de chloramphénicol (30 µg/ml), d'érythromycine (15 µg/ml) et de novobiocine (5 µg/ml).

La paroi cellulaire est de type IIIE: présence d'acide *méso*-diaminopimélique et absence de glycine. Le rhamnose et le galactose sont les sucres caractéristiques présents dans les hydrolysats cellulaires. Les phospholipides sont du type PII (présence dephosphatidyléthanolamine). Les ménaquinones prédominantes sont MK-9(H4) (55%), et à un degré moindre MK-7(H4) (12%) et MK-10(H4) (9%). Les acides gras prédominants sont: iso-C_{16:0} et iso-C_{15:0}, c'est-à-dire, des acides gras à chaînes ramifiées ayant 16 ou 15 atomes de carbone.

La souche-type est SA181^T (DSM = 45457^T; CCUG = 60214^T) isolée à partir d'un échantillon de sol saharien, prélevé dans la région du Hoggar, au Sud de l'Algérie.

2.3.2.- Description de *Saccharothrix saharensis* SA152sp. nov.

La souche SA152 est nommée *Saccharothrix saharensis* (sa.har.en'sis. N.L. fem. adj. *saharensis*, se référant au Sahara, origine du sol où la souche a été isolée).

C'est un actinomycète filamenteux, à Gram-positif, aérobic strict.

Le mycélium aérien est blanc bleuté sur ISP2 et gélose nutritive, gris bleuté sur ISP3 et blanc sur Bennett. Le mycélium du substrat est brun sur ISP2 et gélose nutritive, brun jaunâtre sur ISP3, gris sur Bennett et bleu foncé sur ISP4. Un pigment diffusible bleu foncé est sécrété sur ISP2 et ISP4 et brun rougeâtre sur gélose nutritive. L'isolat ne produit pas de pigments mélanoides.

Le mycélium aérien se fragmente en de longues chaînes de spores en bâtonnets ou ovoïdes (0,8 à 1 µm x 1 à 1,5 µm) non mobiles. Le mycélium du substrat se fragmente modérément.

La température optimale de croissance est de 30°C et la température maximale est de 45°C.

La souche utilise le L-arabinose, le D-cellobiose, le D-fructose, le D-galactose, le D-glucose, le glycérol, le *méso*-inositol, le maltose, le D-mannitol, le D-mannose, l'α méthyl-D-glucoside le D-mélezitose, le rhamnose, le D-raffinose, le D-ribose, la salicine, le D-tréhalose, le xylose, l'acétate, le propionate, le pyruvate et le succinate comme seules sources de carbone, mais pas l'adonitol, le D-lactose, le mélibiose, le saccharose, le sorbitol, le benzoate, le butyrate, le citrate, l'oxalate et le tartrate.

La L-proline est utilisée comme source d'azote, mais pas la L-alanine et la L-sérine.

L'adénine, l'esculine, l'arbutine, l'hypoxanthine et la tyrosine sont dégradées; la caséine, la gélatine et l'amidon sont hydrolysés. La guanine, la testostérone, le Tween 80 et la xanthine ne sont pas dégradés. La nitrate réductase est produite.

La croissance n'a pas lieu à pH 5 et 9 et en présence du chloramphénicol (30 µg/ml) et d'érythromycine (15 µg/ml), mais a lieu en présence de novobiocine (5 µg/ml).

La paroi est de Type IIIE: présence d'acide *méso*-diaminopimélique et absence de glycine. Les sucres caractéristiques dans les hydrolysats cellulaires sont le rhamnose et le galactose. Le phospholipide diagnostique est la phosphatidyléthanolamine, soit, le type PII

de phospholipides. La ménaquinone prédominante est MK-9(H4) (62%), avec des quantités moindres de MK-7(H4) (17%) et MK-10(H4) (6%). Les principaux acides gras sont: iso-C_{16:0} et iso-C_{15:0}.

La souche-type est SA152^T (= DSM 45456^T, = CCUG 60213^T), isolée à partir d'un échantillon de sol saharien recueilli dans la région d'Adrar, au Sud-Ouest de l'Algérie.

2.4.- Taxonomie de la souche SA198

Les données phylogénétiques basées sur l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche SA198 ont permis de la rapprocher de deux espèces: *Saccharothrix australiensis* (Labeda *et al.*, 1984) et *S. algeriensis* (Zitouni *et al.*, 2004a), avec respectivement 98,8 et 98,6% de similarité. L'hybridation ADN-ADN avec ces deux espèces n'a pas été effectuée.

Cependant, au vu du dendrogramme phylogénétique de la figure 6, on remarque que la souche SA198 constitue une lignée qui s'est révélée être bien distincte de ces deux espèces. En effet, les différences génétiques observées sont du même ordre de grandeur que celle obtenues entre *S. australiensis* et *S. algeriensis*, entre *S. syringae* et *S. coeruleofusca* et entre *S. espanaensis* et *S. variisporea*. Ces différences sont même plus importantes que celles observées entre *S. longispora* et *S. yanglingensis*.

On peut citer le cas de *S. espanaensis* et *S. mutabilis* avec une séquence du gène de l'ARNr 16S montrant 99,0% de similarité, et une hybridation ADN-ADN avec 0% de parenté (Labeda et Lechevalier, 1989). *S. syringae* et *S. xinjiangensis* partagent 99,1% de similarité (ARNr 16S), mais ont seulement 50% de parenté après hybridation ADN-ADN (Hu *et al.*, 2004). *S. algeriensis* et *S. australiensis* montrent 98,8% de similarité (ARNr 16S) et uniquement 55,9% de similarité après hybridation ADN-ADN (Zitouni *et al.*, 2004). *S. yanglingensis* et *S. longispora* ont 99,4% de similarité pour l'ARN 16S et 33,8% seulement pour l'hybridation ADN-ADN. Les souches SA181 et SA152 ont respectivement 99,0 et 99,3% de similarité (ARN 16S) avec les espèces les plus proches et se sont révélées pourtant être de nouvelles espèces après hybridation. De plus, Stackebrandt et Gobel (1994) rapportent qu'avec un pourcentage d'homologie compris entre 97 et 99%, l'espèce a une très grande probabilité d'être différente.

Ceci laisse donc très fortement penser que la souche SA198 constitue une espèce nouvelle de *Saccharothrix*.

Ces données sont encore plus confortées par les différences phénotypiques observées entre la souche SA198 d'une part et les espèces *S. australiensis* et *S. algeriensis* d'autre part.

Ces différences concernent la couleur des mycéliums aériens et du substrat, et, comme le montre le tableau 11, la production de pigments mélanoides, et les tests relatifs à l'utilisation ou non de l'hypoxanthine, amidon, citrate, propionate, cellobiose, glycérol, maltose, mannose, saccharose, sorbitol et tréhalose, ainsi que les tests relatifs à la nitrate réductase, à la croissance en présence de 4% de NaCl et à la croissance à 45°C.

Isolats	<i>Saccharothrix</i> SA198	<i>Saccharothrix</i> <i>australiensis</i>	<i>Saccharothrix</i> <i>algeriensis</i>
Tests			
Dégradation de:			
Adénine	-	-	-
Caséine	+	+	+
Hypoxanthine	+	-	-
Xanthine	-	-	-
Hydrolyse de:			
Amidon	-	+	-
Esculine	+	+	+
Gélatine	+	+	+
Décarboxylation de:			
Acétate	+	+	+
Citrate	-	-	+
Propionate	+	+	-
Pyruvate	+	+	+
Oxalate	-	-	-
Succinate	+	+	+
Utilisation de:			
Adonitol	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Cellobiose	+	+	-
Fructose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Glycérol	-	+	+
Inositol	-	-	-
Lactose	-	-	-
Maltose	-	+	+
Mannitol	-	-	-
Mannose	-	+	-
Mélibiose	-	-	-
α méthyl-D-glucoside	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Saccharose	+	-	-
Sorbitol	-	+	-
Tréhalose	-	+	+
Xylose	-	-	-
Production de pigments mélanoides	+	-	-
Nitrate réductase	-	+	+
Croissance en présence de:			
4% NaCl (w/v)	-	+	+
5% NaCl (w/v)	-	-	-
Croissance à 45°C	-	+	+

Tableau 11. Comparaison des caractères physiologiques de *Saccharothrix* SA198 avec *S. australiensis* NRRL 11239^T (Labeda et al., 1984) et *S. algeriensis* NRRL 24137^T (Zitouni et al., 2004a).

Note: +; test positif, -; test négatif.

Sachant que le pourcentage de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S entre la souche SA198 d'une part, et *S. australiensis* et *S. algeriensis* d'autre part, est supérieur à 97%, l'originalité de SA198 devra quand même être confirmée ultérieurement par l'hybridation ADN-ADN avec ces deux espèces.

3.- Conclusion

Les résultats des études morphologique et chimique ont permis d'identifier les isolats SA181, SA152 et SA198 au genre *Saccharothrix*. Les études phylogénétiques basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ont confirmé cette identification et ont

permis de rapprocher les isolats d'espèces bien précises, lesquelles restent quand même différentes par plusieurs caractères phénotypiques (morphologiques et physiologiques).

L'hybridation ADN-ADN effectuées sur les isolats SA181 et SA152 a permis de constater que ce sont de nouvelles espèces de *Saccharothrix*, nommées respectivement *S. hoggarensis* et *S. saharensis*.

Pour la souche SA198, les caractéristiques phénotypiques (morphologiques et physiologiques) et moléculaires (séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S) suggèrent fortement la présence d'une nouvelle espèce, qu'il s'agira cependant de confirmer par l'hybridation ADN-ADN avec *S. australiensis* et *S. algeriensis*

II.- PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DE *SACCHAROTHRIX* SUR MILIEUX SOLIDES

1.- Résultats

Les souches SA198, SA152 et SA181 ont montré un spectre d'action relativement assez large, qui s'étend aussi bien sur les bactéries à Gram positif et Gram négatif que sur les champignons filamenteux et les levures (tableau 12). Cependant, certains de ces microorganismes-cibles appartenant à ces différents groupes sont résistants.

En effet, en considérant les deux milieux, l'activité antibactérienne est estimée à 64% pour l'isolat SA198, à 43% pour l'isolat SA181 et à 50% pour l'isolat SA152. Les bactéries à Gram positif et les champignons filamenteux se sont montrés plus sensibles que les bactéries à Gram négatif et les levures, aussi bien du point de vue du pourcentage d'activité que de l'intensité de l'action. Pour les bactéries à Gram positif, ce pourcentage est de 67% pour les trois souches et pour les champignons, les valeurs atteignent 50, 86 et 64% pour les souches SA152, SA181 et SA198 respectivement. Ces pourcentages sont de 37, 25 et 62% pour les bactéries à Gram négatif, et 33, 67 et 33% pour les levures, et ce, pour les souches SA152, SA181 et SA198, respectivement.

Des trois souches de *Saccharothrix*, SA198 est celle qui présente en général la meilleure activité.

Les activités antibiotiques des trois isolats de *Saccharothrix* varient suivant les milieux de culture.

Pour la souche SA198, si l'on observe une certaine variabilité d'action antibactérienne (selon les bactéries-cibles) entre les milieux ISP2 et Bennett, l'activité antifongique est par contre meilleure sur ISP2.

Pour la souche SA181, les activités antibactériennes et antilevuriennes sont meilleures sur ISP2, tandis qu'on observe une certaine variabilité d'action, au niveau des deux milieux, contre les champignons (selon les champignons-cibles).

Pour la souche SA152, l'activité antibactérienne est en général meilleure sur milieu Bennett et est variable selon les milieux pour les champignons.

Les variabilités d'action entre les deux milieux de culture observées pour certains microorganismes-cibles chez les trois isolats de *Saccharothrix* suggèrent que ces derniers

produisent chacun deux ou plusieurs antibiotiques favorisés tantôt par l'ISP2, tantôt par le milieu Bennett.

Les variabilités d'action entre les trois souches suggèrent aussi qu'elles sécrètent des antibiotiques différents.

Bien que le spectre d'action des trois souches soit relativement assez large dans le sens où les quatre groupes de microorganismes-cibles (bactéries à Gram positif et à Gram négatif, champignons filamenteux et levures) sont touchés, il est intéressant de noter la spécificité d'action au sein d'un même groupe de germes-cibles, certains étant fortement inhibés contrairement à d'autres.

Il est ainsi intéressant de signaler les très fortes (30 à 50 mm d'inhibition) et fortes (20 à 27 mm d'inhibition) activités de certains isolats contre certains microorganismes-cibles.

Parmi les germes-cibles très fortement inhibés, nous retrouvons *Pseudomonas syringae* (50 mm), *Aspergillus carbonarius* (40 mm), *Mucor ramannianus* (43 mm) et *Penicillium expansum* (45 mm), inhibés par SA198, et aussi *A. carbonarius* (30 mm), *Fusarium equiseti* (40 mm) et *P. expansum* (37 mm), inhibés par SA152.

Parmi les microorganismes-cibles fortement inhibés, nous retrouvons *Enterococcus faecalis* (25 mm), *Bacillus subtilis* (20 mm), *Ascochyta fabae* (27 mm), *Fusarium culmorum* (20 mm) et *F. equiseti* (20 mm), inhibés par SA198, et *B. subtilis* (20 mm), *F. culmorum* (22 mm) et *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (20 mm), inhibés par SA181.

Par contre, certains microorganismes-cibles se sont montrés résistants aux trois souches de *Saccharothrix*, comme c'est le cas d'*Agrobacterium tumefaciens*, *Serratia marcescens* et *Aspergillus ochraceus*.

D'autres sont faiblement ou pas inhibés, comme c'est le cas des levures (*Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis* et *Saccharomyces cerevisiae*), de certains champignons (ex.: *Botrytis cinerea*), certaines bactéries à Gram négatif (ex.: *Proteus vulgaris*) et certaines bactéries à Gram positif (ex.: *Staphylococcus aureus*).

2.- Discussion

Les souches SA198, SA181 et SA152 de *Saccharothrix* possèdent des activités à la fois antibactériennes (Gram positif et Gram négatif) et antifongiques (champignons filamenteux et levures). Leur activité est variable suivant les microorganismes-cibles et selon le milieu de culture. Cette variabilité laisse ainsi penser à la sécrétion de plus d'un antibiotique par souche et qui seraient différents entre les souches.

Microorganismes-cibles	Distance d'inhibition (mm)					
	Milieux de culture et souches					
	ISP 2			Bennett		
Bactéries à Gram positif	SA152	SA181	SA198	SA152	SA181	SA198
<i>Bacillus coagulans</i>	4	2	19	0	0	16
<i>B. subtilis</i>	10	20	20	8	20	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	25	8	0	21
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	9	0	0	8
<i>Micrococcus luteus</i>	14	10	0	15	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	6	0	0	0	0
Bactéries à Gram négatif						
<i>Escherichia coli</i>	0	0	9	5	0	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	9	2	0	6	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	8	6	0	8
<i>P. syringae</i>	10	0	2	50	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	4	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i>	0	10	0	0	8	0
Champignons filamenteux						
<i>Ascochyta fabae</i>	8	0	27	0	5	13
<i>Aspergillus carbonarius</i>	30	0	40	35	14	30
<i>A. flavus</i>	10	0	0	0	0	1
<i>Aspergillus sp.</i>	0	7	0	0	0	0
<i>Botrytis cinerea</i>	0	9	0	0	0	0
<i>Fusarium equiseti</i>	40	5	20	20	4	10
<i>F. culmorum</i>	10	14	20	3	22	10
<i>F. oxysporum f. sp. albedinis</i>	0	0	0	0	20	0
<i>F. proliferatum</i>	0	10	6	0	4	0
<i>Mucor ramannianus</i>	12	9	43	0	4	18
<i>Penicillium expansum</i>	37	14	45	15	12	38
<i>Penicillium sp.</i>	0	9	0	0	4	0
<i>Phoma sp.</i>	0	9	2	0	4	0
Levures						
<i>Candida albicans</i>	0	5	0	0	6	0
<i>Kluyveromyces lactis</i>	5	0	0	10	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	9	0	0	0	6

Tableau 12. Activité antibiotique des souches SA152, SA181 et SA198 de *Saccharothrix*.

Note: les bactéries et le champignon filamenteux suivants ne sont pas inhibés par les isolats SA152, SA181 et SA198: *Agrobacterium tumefaciens*, *Serratia marescens* et *Aspergillus ochraceus*

Le pouvoir antagoniste exprimé par les trois souches de *Saccharothrix* n'est pas étonnant en soi, vu que ce genre est connu comme recelant des souches et espèces productrices de plusieurs

antibiotiques d'une grande diversité structurale et à spectre d'action intéressant.

Ces antibiotiques appartiennent aux familles et groupes des aminoglycosides et benzoquinones (Takahashi *et al.*, 1986), glycopeptides (Takeuchi *et al.*, 1992), nucléosides carboxyliques (Bush *et al.*, 1993), heptadécaglycosides (Singh *et al.*, 2000), dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002), anthracyclines (Zitouni *et al.*, 2004b,c), macrolides (Powell et Roush, 2001; Zitouni, 2005; Murakami *et al.*, 2009), angucyclines (Kalinovskaya *et al.*, 2010) et aromatiques benzéniques (Aouiche *et al.*, 2012).

L'activité des molécules produites par les souches de *Saccharothrix* est surtout dirigée contre les bactéries à Gram positif, parfois contre les champignons et rarement contre les bactéries à Gram négatif (Braznikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979; Isshikiet *al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1992; Kinoshita *et al.*, 1999; Wang *et al.* 2000; Lamari *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2002; Zitouni, 2005). Néanmoins, une activité antibactérienne importante dirigée contre des bactéries à Gram négatif a déjà été signalée par Suzuki *et al.* (1991) chez *Saccharothrix mutabilis* subsp. *chichijimaensis* productrice de tétrazomine, et plus récemment, par Aouiche *et al.* (2012) chez *Saccharothrix* sp. PAL54 productrice de chloramphénicol.

Même si d'une façon globale, l'activité des trois souches de *Saccharothrix* s'avère plus intéressante sur milieu ISP2, ceci n'empêche pas qu'elle varie d'un isolat à un autre suivant le milieu de culture; pour certaines, c'est le milieu ISP2 (qui contient de l'extrait de malt) et pour d'autres, c'est le milieu de Bennett (qui contient de la peptone).

Un constat similaire a été signalé par Badji (2006), Boudjella (2007), Belghit (2010), Driche (2010), Khébizi (2010), Rachedi (2010), Toumatia (2010) et Aouiche (2011) qui ont obtenu de bons résultats avec ces deux milieux, avec cependant une légère préférence pour le milieu ISP2 d'une manière générale. L'importance des milieux de culture, dont certains composants jouent un rôle important en tant que précurseurs d'antibiotiques, n'est donc pas à négliger.

Nos travaux se sont poursuivis par la suite sur les antibiotiques de *Saccharothrix* sp. SA198 qui a présenté les meilleures activités antagonistes.

III.- ETUDE DES ANTIBIOTIQUES SECRETES PAR SACCHAROTHRIX SP. SA198

1.- Cinétiques de production des antibiotiques en milieux liquides

1.1.- Résultats

Dans le but de déterminer le meilleur milieu de production d'antibiotiques et le jour optimal de production, des cultures en fioles Erlenmeyers dans les milieux ISP2 et Bennett ont été menées pour la souche SA198 qui a montré une meilleure activité antibiotique sur milieux solides que les souches SA152 et SA181.

Au cours de la fermentation, la production d'antibiotiques (méthode de diffusion des puits) et le pH sont mesurés quotidiennement pendant 10 jours. L'activité antibiotique est détectée en utilisant trois germes-cibles choisis parmi les plus sensibles, à savoir *Bacillus subtilis* (bactérie à Gram positif) et deux champignons filamenteux, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramannianus*.

Une cinétique de croissance de la souche SA198 a été effectuée sur le meilleur milieu de production, de manière à faire une corrélation entre croissance et production d'antibiotiques.

Les résultats illustrés par la figure 7 montrent que:

- Le milieu ISP2 est meilleur que le milieu Bennett pour la production d'antibiotiques si on se réfère aux inhibitions maximales observée chez *Bacillus subtilis* (31 mm sur ISP2 et 27 mm sur Bennett), *Aspergillus carbonarius* (32 mm sur ISP2 et 24 mm sur Bennett) et *Mucor ramannianus* (39 mm sur ISP2 et 24 mm sur Bennett).
- L'activité contre *Bacillus subtilis* est décelée le 1^{er} jour (sur ISP2) et le 3^{ème} jour (sur Bennett) et atteint un optimum le 8^{ème} et le 10^{ème} jour sur ces deux milieux, respectivement.
- L'activité antifongique, testée contre *Mucor ramannianus* (MR) et *Aspergillus carbonarius* (AC), est synchrone sur milieu ISP2, entre les deux champignons (à l'exception du 10^{ème} jour) et avec l'activité antibactérienne. L'activité débute le 1^{er} jour pour MR et le 2^{ème} jour pour AC. Le maximum de production est obtenu le 8^{ème} jour, tout comme pour l'activité antibactérienne. Dans le milieu Bennett, cette activité, bien qu'elle débute dès le 1^{er} jour, est moins intéressante et un optimum de production est enregistré le 9^{ème} et le 10^{ème} jour contre MR et AC respectivement.
- Dans les deux milieux, le pH ne varie que légèrement. Il augmente jusqu'au 2^{ème} jour, puis diminue vers le 4^{ème} jour pour se stabiliser le 7^{ème} jour. Il augmente de nouveau, mais très légèrement, pour diminuer un peu le dernier jour de fermentation.

Les cultures deviennent colorées après la production de pigments solubles de couleur brun jaunâtre clair les premiers jours et qui deviennent de plus en plus foncés le 8^{ème} jour.

La figure 8 montre que:

- La croissance de *Saccharothrix* SA198 débute par une phase exponentielle qui dure 48 h. Après une phase de ralentissement observée entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour, nous observons une phase stationnaire ou de légère croissance qui s'étend du 3^{ème} au 7^{ème} jour. La croissance reprend de nouveau entre le 7^{ème} et le 8^{ème} jour, se stabilise puis décroît vers la fin.
 - Les activités antibactériennes et antifongiques débutent durant la première phase exponentielle, pour atteindre des valeurs très appréciables en phases de ralentissement, stationnaire et de légère croissance. Ces activités reprennent pour atteindre un maximum le 8^{ème} jour, durant la seconde (et courte) phase exponentielle, pour diminuer par la suite (à l'exception de l'activité contre *Aspergillus carbonarius* qui continue d'augmenter légèrement).

1.2.- Discussion

La croissance de *Saccharothrix* sp. SA198 sur milieu ISP2 liquide en condition agitée débute par une phase exponentielle. L'absence d'une phase de latence, connue pour être due au temps d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de culture, ainsi qu'à l'âge de l'inoculum, peut être expliquée par le fait que nos précultures soient menées dans les mêmes conditions que les cultures et qu'elles soient prises en phase exponentielle de croissance.

La croissance de cette souche rappelle la croissance diauxique observée dans certains cas où les milieux contiennent deux sources carbonées, telles par exemple le glucose et le lactose, ou le glucose et le galactose, où encore le glucose et le xylose (Prescott *et al.*, 2002). Bien que ce ne soit pas un cas de diauxie classique, il est en effet possible de constater la présence de deux phases exponentielles séparées entre elles par une phase stationnaire ou de ralentissement. La deuxième phase exponentielle a la particularité d'être très courte, tardive, et avec une croissance un peu faible.

La croissance diauxique a été observée non seulement chez les bactéries non mycéliennes, mais aussi chez les actinomycètes, y compris avec les souches de notre laboratoire (Strub, 2008; Chorin, 2009; Driche, 2010; Toumatia, 2010; Aouiche, 2011; Merrouche, 2012). Le phénomène

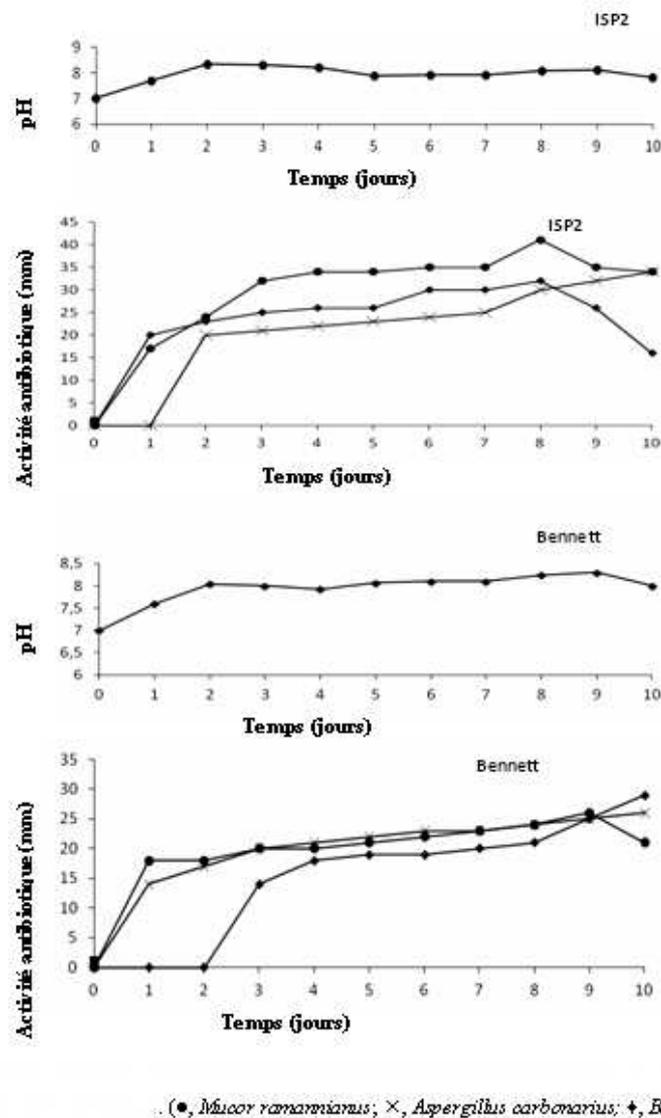
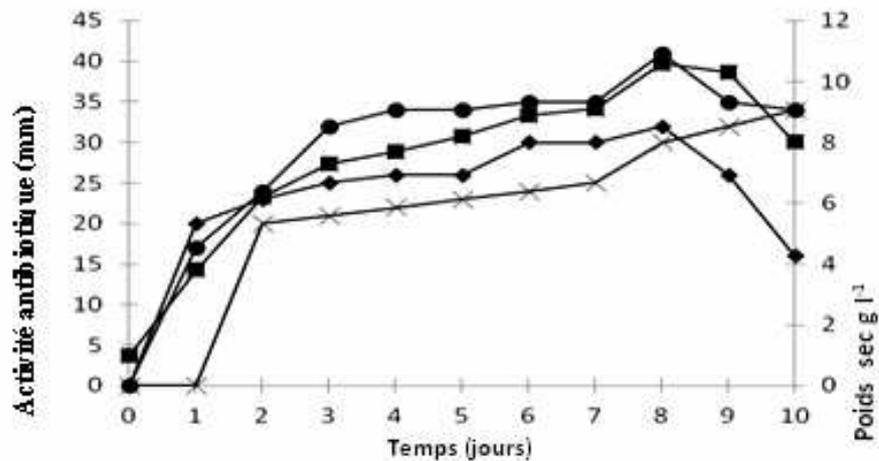


Figure 7. Activités antimicrobiennes et évolution du pH de *Saccharothrix sp.* SA198 en milieu liquide ISP2 et Bennett.



(●, *Mucor ramannianus*; ×, *Aspergillus carbonarius*; †, *Bacillus subtilis*; ■, poids sec).

Figure 8. Cinétique de croissance et de production d'antibiotiques en milieu ISP2 de *Saccharothrix* sp. SA198.

de diauxie a particulièrement été étudié avec un peu plus de détail par Strub (2008) chez *Saccharothrix algeriensis* SA233 (NRRL B-24137). Dans ce cas, ce phénomène se manifeste sur un milieu semi-synthétique contenant une seule source osidique (glucose) et une source azotée (matérialisée par une petite quantité d'extrait de levure). Cet auteur a constaté que ce sont les acides aminés de l'extrait de levure (en particulier ceux chargés négativement et ceux de faible poids moléculaire) qui sont dans un premier temps préférés par l'actinomycète pour sa croissance. Ces acides aminés sont utilisés durant la première phase exponentielle et le glucose, majoritairement durant la deuxième phase exponentielle.

Pendant, contrairement aux résultats de Strub (2008), la première phase de croissance est, dans notre cas, nettement plus longue que la seconde, et le milieu que nous avons utilisé (ISP2) est assez complexe, et contient une grande quantité d'extrait de malt (qui apporte beaucoup de glucides), du glucose et de l'extrait de levure. Le mécanisme en lui-même apparaît donc beaucoup plus complexe. Mais il semble bien que, comme pour *S. algeriensis*, l'extrait de levure soit beaucoup plus utilisé préférentiellement (par rapport aux glucides) durant les premiers jours d'incubation, comme on le constate à travers l'alcalinisation du milieu de culture.

En effet, le pH, aussi bien sur milieu ISP2 que Bennett (lequel contient de la peptone, de l'extrait de levure et du glucose) devient alcalin les premiers temps, sans doute après une plus grande utilisation d'extrait de levure (et de peptone) par rapport aux sucres. Cette alcalinisation est due à la dégradation des acides aminés présents dans l'extrait de levure (et la peptone), qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier provoque l'augmentation du pH du milieu, comme l'a souligné Strub (2008) pour *Saccharothrix algeriensis*. Le pH diminue ensuite de nouveau, dû à la dégradation des glucides présents dans les deux milieux de culture.

L'activité antibiotique (antibactérienne et antifongique) est meilleure sur ISP2 (riche en extrait de malt) que sur milieu Bennett (contenant de la peptone) (les deux milieux contiennent de l'extrait de levure et du glucose). Il est donc évident que les composants de l'extrait de malt aient joué un rôle important dans l'augmentation de cette activité sur milieu

ISP2. Il se pourrait aussi que le glucose présent en grande quantité sur Bennett (10 g/l, contre 4 g/l pour l'ISP2) ait joué un rôle néfaste.

En effet, selon plusieurs auteurs, tels que Kimura (1967), Komuneck (1972), Hurley et Bialek (1974) et Kennel et Demain (1983), pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, le glucose, source de carbone rapidement assimilable, exerce à une certaine concentration une répression catabolique sur la production d'antibiotiques tels que l'actinomycine, la bacitracine, la céphalosporine C, le chloramphénicol, la kanamycine, la pénicilline, etc. Pour une concentration de 10 g/l de glucose, Zitouni (2005) a montré un effet répressif de ce sucre sur la production d'antibiotiques nucléosidiques, mais pas sur les macrolides synthétisés par *Saccharothrix* sp. SA103 isolée d'un sol saharien. Compte tenu de la complexité des milieux testés, il est difficile d'attribuer une explication rationnelle aux différences observées au niveau de la production en passant d'un milieu à un autre.

L'ISP2 a été en général le meilleur milieu de culture pour la production d'antibiotiques, comme l'ont souligné Badji (2006) et Boudjella (2007) qui ont testé presque une dizaine de milieux à cet effet.

Par ailleurs, la couleur brun foncé que prend la culture de SA198 au cours du temps pourrait être corrélée à la sécrétion des produits actifs. En effet, l'activité est d'autant plus importante que la couleur devient plus foncée, ce qui coïncide avec le maximum de production.

L'activité antibiotique en milieu ISP2 débute fortement durant la première phase exponentielle. Elle continue progressivement à augmenter durant les phases de ralentissement et stationnaire, pour re-augmenter plus fortement à la fin de la seconde phase exponentielle (qui représente l'optimum de production). En général, la production de métabolites secondaires par les microorganismes a lieu durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinomycètes cette production peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire et de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

Les travaux de Strub (2008) et de Merrouche (2012) ont montré que la production de la thiolutine (antibiotique hétérocyclique contenant du soufre et de l'azote), bien qu'elle débute en phase exponentielle, apparaît découplée de la croissance et interviendrait après un ralentissement significatif de cette croissance, le maximum étant obtenu en phase stationnaire. Cependant, la production des métabolites secondaires reste, comme l'ont souligné Drew et Demain (1977) sous l'influence du métabolisme primaire.

Au vu de ces résultats, la souche SA198 ayant montré une bonne activité en milieu liquide, a fait l'objet d'un approfondissement des études sur les antibiotiques qu'elle sécrète.

2.- Extraction et mise en évidence des antibiotiques

2.1.- Résultats

2.1.1.- Extraction des antibiotiques

L'extraction des antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* SA198 sur milieu ISP2 est réalisée le 8ème jour de fermentation (jour optimal de production). Après centrifugation, le filtrat de culture est récupéré et les antibiotiques sécrétés sont extraits par quatre solvants organiques de polarité différente (*n*-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol). Des volumes de 100 ml de filtrat de culture sont extraits chacun par un volume égal de solvant. Les extraits organiques et aqueux sont concentrés à sec, puis récupérés

dans 1 ml de méthanol pour tester leur activité par la méthode des disques de papier contre *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramannianus*. Le nombre des antibiotiques extraits est alors déterminé et localisé par bioautographie.

Dans ce cas, c'est le dichlorométhane qui s'est révélé être le meilleur solvant d'extraction. L'extrait mycélien et encore plus la phase aqueuse résiduelle du filtrat sont moins actifs, comme cela est indiqué ci-après et dans la figure 9.

2.1.1.1.- Extraction à partir du mycélium

L'extrait du mycélium (brun foncé quand il est concentré et jaune quand il est dilué) présente une activité bonne contre *Mucor ramannianus* (24 mm) et faible contre *Bacillus subtilis* (11 mm) et *Aspergillus carbonarius* (10 mm).

2.1.1.2.- Extraction à partir du filtrat de culture

Des activités antibactériennes et antifongiques sont notées dans les phases organiques des extraits au dichlorométhane, au *n*-butanol et à l'acétate d'éthyle, mais aucune activité n'a été décelée dans l'extrait au *n*-hexane (tableau 13). L'activité antimicrobienne extraite par le dichlorométhane est meilleure que celle extraite par l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Le dichlorométhane sera donc retenu pour la suite de nos expérimentations pour l'extraction des activités antibiotiques, car il a en plus l'avantage d'extraire beaucoup moins d'impuretés (par rapport aux autres solvants) qui gêneraient la purification par HPLC. L'extrait actif au dichlorométhane est, tout comme l'extrait mycélien, brun foncé quand il est concentré et jaune quand il est dilué.

L'activité résiduelle de la phase organique obtenue après extraction au dichlorométhane a été également testée pour son antagonisme par la méthode des disques de papier. Les résultats montrent que cette phase présente une faible activité (10 mm y compris le diamètre des disques qui est de 6 mm) (tableau 13). Cet extrait a donc été éliminé.

2.1.2.- Détection des antibiotiques par bioautographies

Même si le meilleur solvant d'extraction s'est avéré être le dichlorométhane, nous avons voulu savoir si les différents solvants extraient les mêmes antibiotiques ou non. Pour cela, nous avons effectué des bioautographies sur plaques de gel de silice des extraits des filtrats de culture au *n*-hexane (pour confirmer l'absence d'activité), au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol, ainsi que de l'extrait méthanolique du mycélium.

Les systèmes de solvants de migration utilisés sont acétate d'éthyle-méthanol ou AM (100-15, v/v) et *n*-butanol-acide acétique-eau ou BAE (3-1-1, v/v). Les microorganismes-cibles sont *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramannianus*.

Dans le système de solvants AM, comme le montre la figure 10, une tache active notée A ($R_f = 0,37$) est détectée dans les extraits au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol. Cette tache est de couleur jaune foncé à l'œil nu et absorbe (brun terne) à 254 nm. Elle est fortement active contre *B. subtilis* et *M. ramannianus* et modérément active contre *A. carbonarius*. D'autres taches, qui sont des impuretés inactives, sont détectées, mais uniquement aux UV, à 254 et 365 nm. La tache active A (ainsi que d'autres taches) est absente dans l'extrait au *n*-hexane, ce qui confirme l'absence d'activité de cet extrait.

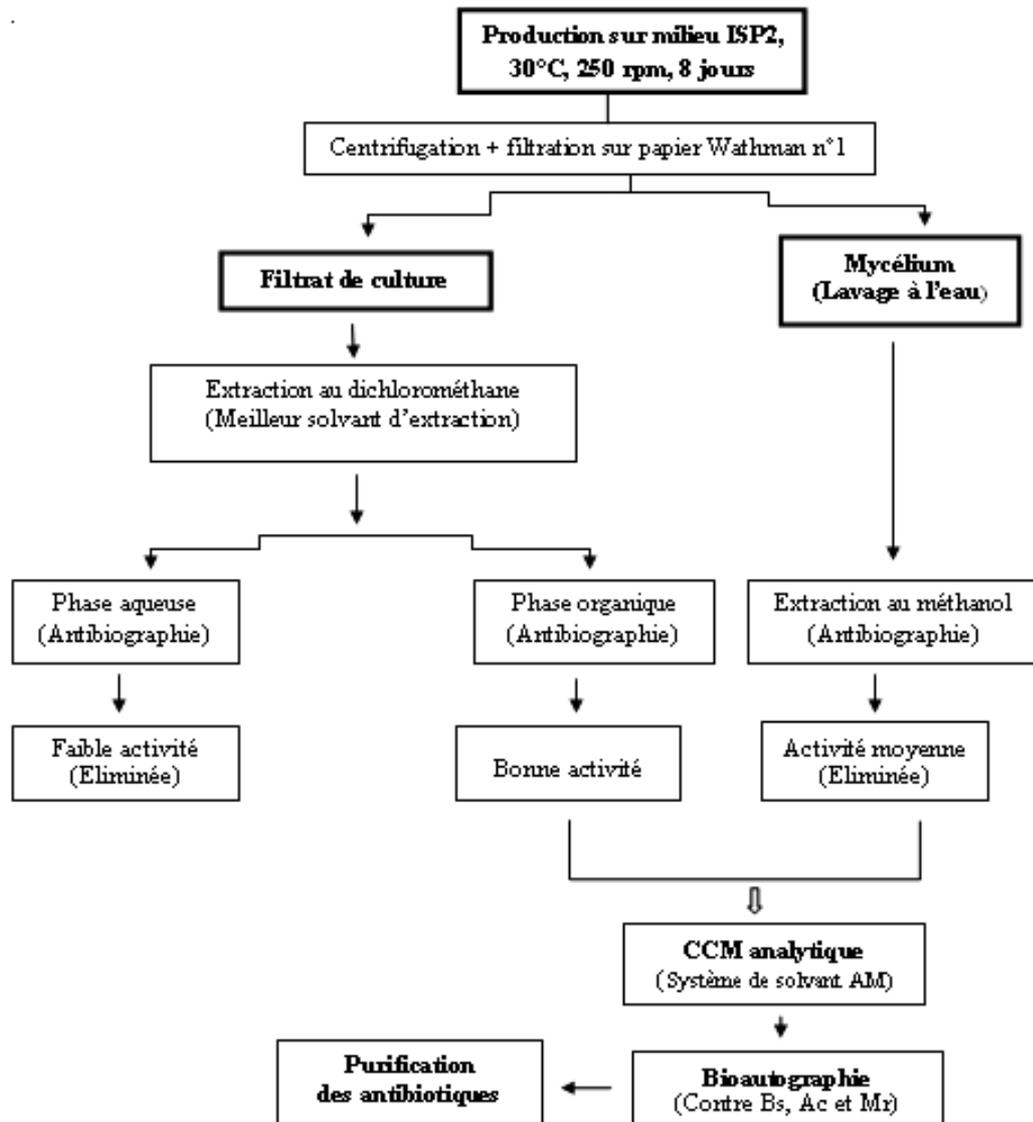


Figure 9. Résultats montrant la meilleure procédure de production et d'extraction des antibiotiques de *Saccharothrix* sp. SA198.

AM: acétate d'éthyle-méthanol (100-15, v/v).

Bs, *Bacillus subtilis*; Ac, *Aspergillus carbonarius*; Mr, *Mucor ramannianus*.

Germes-cibles	Diamètre d'inhibition (mm)*				
	Extraits organiques				Phase aqueuse **
	<i>n</i> -hexane	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	<i>n</i> -butanol	
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	38	15	17	10
<i>Aspergillus carbonarius</i>	NA	17	2	10	10
<i>Mucor ramannianus</i>	NA	35	12	13	10

Tableau 13. Activités antimicrobiennes des différentes phases d'extraction (organiques et aqueuse) de *Saccharothrix* sp. SA198.

Note:

* Le diamètre du disque de papier (6 mm) est compris dans les mesures.

** Laphase aqueuse est obtenue après extraction du filtrat de culture au dichlorométhane.

NA = non actif.

En revanche, dans l'extrait méthanolique du mycélium, nous notons la présence d'une autre tache active, notée B et qui ne migre pas (Rf= 0). L'activité de B est modérée contre les deux champignons testés et faible contre *B. subtilis*.

Dans le système de solvants BAE, les mêmes antibiotiques sont détectés mais mal séparés (des contaminants inactifs). Le système AM sera donc retenu pour la suite de notre travail.

2.2.- Discussion

Saccharothrix SA198 sécrète des antibiotiques qui ont été mis en évidence dans le filtrat de culture et dans le mycélium. Le dichlorométhane s'est avéré être le meilleur solvant d'extraction, ce qui est intéressant car c'est le solvant qui extrait le moins d'impuretés, rendant ainsi la purification finale par HPLC relativement plus facile (Lamari, 2002a; Zitouni, 2005; Merrouche, 2010), surtout par rapport au *n*-butanol qui extrait beaucoup d'impuretés qui rendent les purifications plus difficiles (Zitouni, 2005; Boudjella, 2007).

Deux zones actives, nommées A et B, ont été mises en évidence par CCM chez la souche SA198. Ces deux zones peuvent correspondre chacune à un seul ou à plusieurs antibiotiques. En effet, dans les travaux effectués précédemment dans notre laboratoire, une tache active sur CCM peut correspondre parfois, et après analyse par HPLC, à un seul antibiotique, comme c'est le cas de l'actinomycine sécrétée par *Streptomyces mutabilis* AA1 (Toumatia, 2010) ou du chloramphénicol sécrété par *Saccharothrix* sp. PAL54 (Aouiche et al., 2012). Mais dans la plupart des cas, chaque tache s'est avérée être un complexe de plusieurs antibiotiques très proches entre eux, comme c'est le cas de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137^T (Lamari et al., 2002a,b; Merrouche et al., 2010 et 2011), *Saccharothrix* sp. SA 103 (Zitouni et al., 2004b,c), *Actinomadura* sp. AC104 (Badji et al., 2006), *Nonomuraea* sp. NM94 (Badji et al., 2007), *Streptosporangium* sp. Sg3 (Boudjella et al., 2007), etc.

Les antibiotiques sécrétés par la souche SA198 ont à la fois une activité antibactérienne et antifongique, ce qui exclut la présence de composés polyéniques qui sont plutôt antifongiques (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988).

Le produit A est sécrété totalement dans le filtrat de culture, contrairement au produit B qui reste à l'intérieur du mycélium. Plusieurs auteurs ont montré que les antibiotiques externes sont les mêmes que ceux qui sont internes (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007),

mais ceci n'écarte pas le fait que dans certains cas assez rares, les antibiotiques peuvent être différents (Hacène *et al.*, 1994).

Le produit A est celui qui est le plus actif et migre sur CCM loin des impuretés, et ce, contrairement au produit B qui reste au niveau du dépôt. A est donc non seulement plus actif, mais plus facile à purifier.

De ce fait, la suite de notre étude a porté essentiellement sur le produit A (qui peut en fait être un complexe d'antibiotiques) en vue de le caractériser de manière plus approfondie.

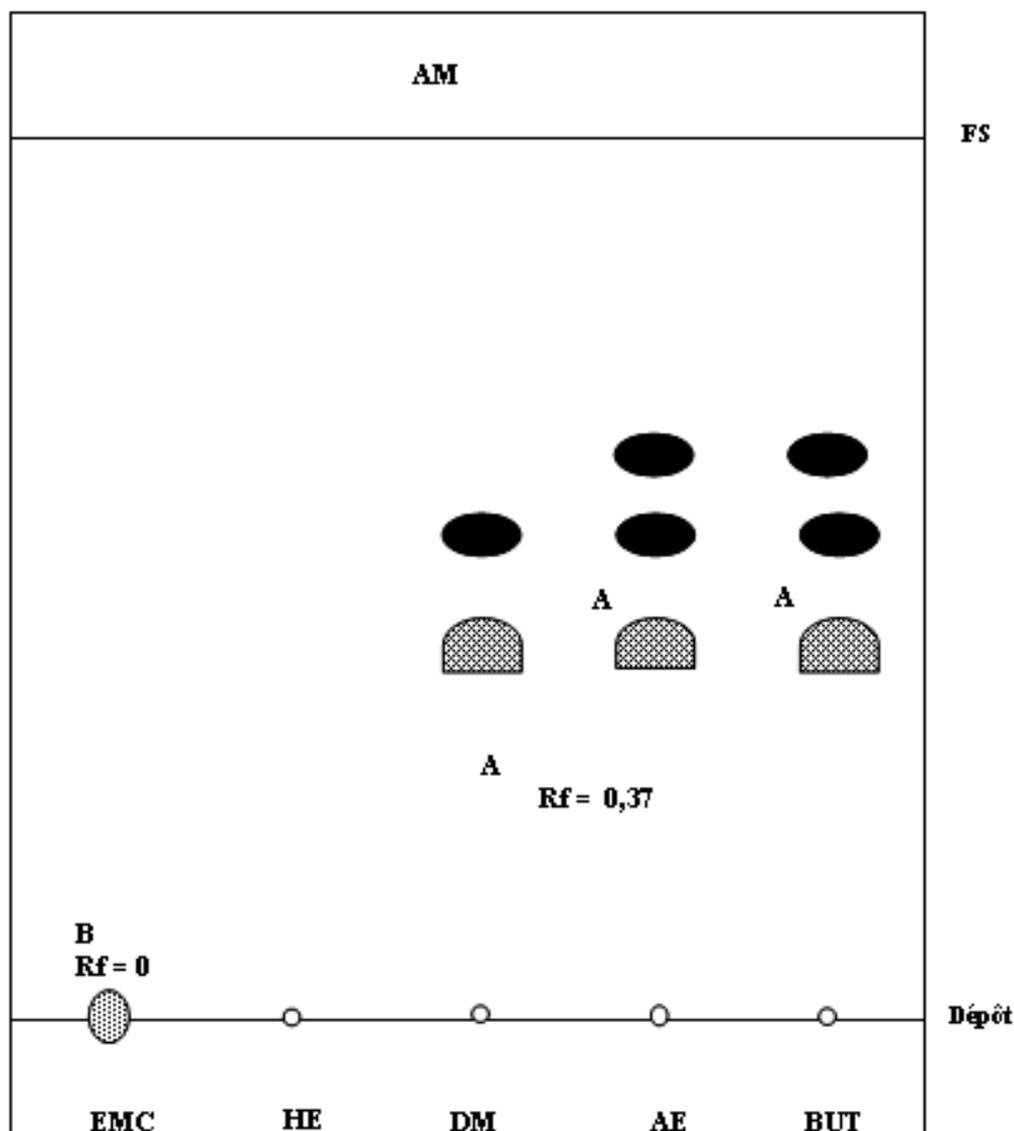


Figure 10. Localisation des activités par bioautographie des différents extraits organiques du filtrat de culture et du mycélium de *Saccharothrix* sp. SA198.

AM, solvant de migration: acétate d'éthyle-méthanol (100-15 v/v); FS, front de migration du solvant; Rf, rapport frontal; EMC, extrait méthanolique des cellules; HEX, *n*-hexane; DM, dichlorométhane; AE, acétate d'éthyle; BUT, *n*-butanol.

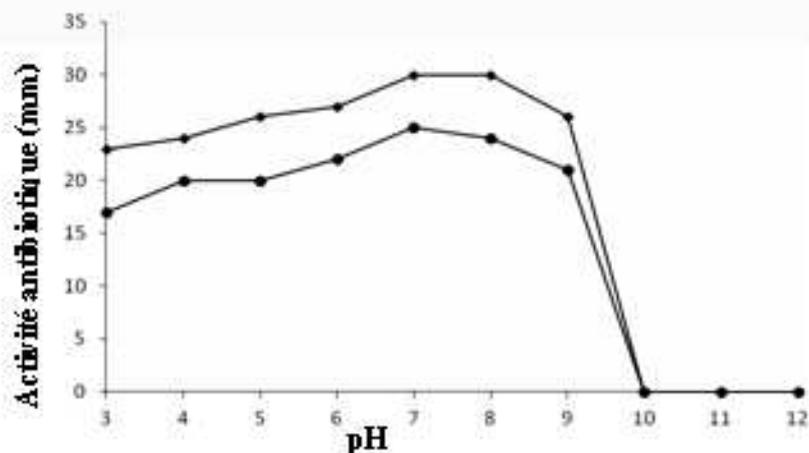
, , tache inactive détectée à 254 et à 365 nm; , tache active contre *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramannianus*.

3.- Etude de la stabilité de l'activité antibiotique

3.1.- Résultats

3.1.1.- Effet du pH

Les résultats de la figure 11 montrent que l'activité antibiotique est surtout sensible aux pH alcalins. En effet, au-delà du pH 9 aucune activité n'est détectée, contrairement aux pH acides (pH 3, 4, 5 et 6). Une augmentation de l'activité est corrélée à une augmentation progressive du pH. Cependant, une meilleure activité est obtenue à pH 7. Le témoin (activité antibactérienne est de 25 mm et l'activité antifongique est de 30 mm).



(●, activité contre *Bacillus subtilis*; ○, activité contre *Mucor ramannianus*).

Figure 11. Effet du pH sur les activités antibiotiques du filtrat de culture de *Saccharothrix* sp. SA198.

La méthode utilisée est celle des puits. Le diamètre du puits (10 mm) n'est pas compris dans les mesures.

3.1.2.- Effet de la température

L'activité antibiotique semble résister partiellement aux températures élevées. D'après les résultats consignés dans le tableau 14, 60% de l'activité antibactérienne est conservée après un autoclavage à 120°C pendant 10 min, 72% après un traitement thermique à 100°C pendant 30 min et 80% après un traitement de 70°C pendant 45 min. Les activités

antifongiques sont de l'ordre de 53, 67 et 77% après un traitement à 120°C pendant 10 min, à 100°C pendant 30 min et à 70°C pendant 45 min, respectivement.

Germe-cibles	Traitement thermique (Diamètre d'inhibition en mm)				
	Témoin	50°C 60 min	70°C 45 min	100°C 30 min	120°C 10 min
<i>Bacillus subtilis</i>	25	23	20	18	15
<i>Mucor ramannianus</i>	30	27	23	20	16

Tableau 14. Effet de la température sur les activités antibiotiques du filtrat de culture de *Saccharothrix sp.* SA198.

La méthode utilisée est celle des puits. Le diamètre du puits (10 mm) n'est pas compris dans les mesures.

3.1.3.- Effet de la lumière

L'activité antibiotique est peu ou pas sensible à l'effet lumière, surtout en ce qui concerne celles des résidus secs. Cependant, une faible diminution de l'activité est observée dans les filtrats de culture (tableau 15).

Echantillon	Activité antibiotique (mm)					
	Obscurité		Lumière du jour 24 h		Exposition à 100 Watts 24 h	
	Bs	Mr	Bs	Mr	Bs	Mr
Filtrat de culture	25	30	20	26	20	24
Résidu sec	25	33	25	33	23	28

Tableau 15. Effet de la lumière sur les activités antibiotiques du filtrat de culture et du résidu sec de *Saccharothrix sp.* SA198.

Note: Bs; *Bacillus subtilis*, Mr; *Mucor ramannianus*.

La méthode utilisée est celle des puits. Le diamètre du puits (10 mm) n'est pas compris dans les mesures.

3.1.4.- Effet de la conservation au froid

Les résidus secs conservés à - 32°C, perdent 19 à 14% de leur activité antibiotique (antibactérienne et antifongique, respectivement) après une année de conservation. Cette perte devient de plus en plus importante après deux, trois et quatre années de conservation. En effet, seulement 25% de l'activité antibactérienne est conservée après quatre années de conservation (tableau 16).

Germes-cibles	Conservation à - 32 °C				
	Activité antibiotique (mm)				
	Témoin	1 an	2 ans	3 ans	4 ans
<i>Bacillus subtilis</i>	32	26	21	9	8
<i>Mucor ramannianus</i>	36	31	29	13	12

Tableau 16. Effet de la conservation sur les activités antibiotiques des résidus secs semi-purifiés de *Saccharothrix* sp. SA198.

Méthode utilisée: antibiographie sur disque de papier. Le diamètre du disque (6 mm) est compris dans les mesures.

3.2.- Discussion

L'effet de certains facteurs physicochimiques sur les activités antibiotiques a montré que les antibiotiques de *Saccharothrix* sp. SA198 sont plutôt sensibles aux pH basiques et partiellement résistants aux températures élevées (100°C et 120°C). Une perte d'activité partielle est notée après une année de conservation et devient de plus en plus importante après deux, trois et quatre années. Cependant, une exposition à la lumière n'affecte pas beaucoup l'activité antibiotique.

Larpen-Gourgaud et Sanglier (1992) et Scriban (1999) rapportent que plusieurs molécules d'origine biologique sont sensibles aux variations de pH, de température et de lumière.

Les dithiopyrrolones (antibiotiques hétérocycliques) de *Saccharothrix algeriensis* sont partiellement résistants à la chaleur, mais sensibles à la lumière et aux pH alcalins (Lamari, 2006). Par contre, les antibiotiques aromatiques (benzéniques) sécrétés par *Nonomuraea* sp. NM94 sont sensibles à la chaleur, partiellement résistants aux pH alcalins et résistants à une conservation d'une année au congélateur à - 32°C (Badji, 2006).

Dans notre cas, la connaissance de l'influence de certains paramètres physicochimiques sur les antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198 nous permettra de prendre certaines précautions lors des futures expérimentations (purification, études spectroscopiques, détermination des activités biologiques), notamment en évitant les pH alcalins, les températures trop élevées et la durée de conservation au congélateur qui doit être moins d'une année.

4.- Purification des antibiotiques

4.1.- Résultats

4.1.1.- Production des antibiotiques en milieu ISP2

Les analyses spectroscopiques des antibiotiques (notamment la RMN) nécessitent une certaine quantité d'antibiotiques purs. Afin d'obtenir ces quantités, nous avons entrepris des cultures de *Saccharothrix* sp. SA198 en milieu ISP2 en fioles d'Erlenmeyers pendant 8 jours d'incubation (jour optimal de production déterminé précédemment) à 30°C et à 250 rpm. Autotal, sept litres de culture ont été produits. Les extractions sont effectuées au dichlorométhane (meilleur solvant d'extraction). La phase organique est évaporée à sec au

rotavapeur à 40°C et l'extrait sec brun très foncé est récupéré dans un minimum de solvant organique pour réaliser les différentes étapes de purification (figure 12).

4.1.2.- Semi-purification des antibiotiques

Les antibiotiques sont semi-purifiés par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice. L'extrait brut au dichlorométhane est alors spoté en lignes continues. Les plaques sont développées dans le système de solvants AM. Des bioautographies sont menées en parallèle. La bande active A est facilement repérée grâce à sa couleur jaune foncé et à son Rf. Elle est grattée et récupérée séparément, désorbée de la silice avec du méthanol, concentrée à sec et stockée au congélateur à - 32°C durant 1 à 6 mois, avant d'être purifiée par HPLC.

4.1.3.- Purification des antibiotiques par HPLC et activités

4.1.3.1.- Purification après solubilisation dans du méthanol

La purification par HPLC a été effectuée pour le produit A qui a montré une activité antibiotique. Ce produit est d'abord bien solubilisé dans du méthanol, ultrafiltré (filtres à pores de 0,2 µm), puis injecté en HPLC, selon le programme suivant: phase inverse, gradient continu de 30 à 100% de méthanol-eau pendant 40 min et élué à 1,5 ml/min (plusieurs programmes préliminaires ont été testés pour rechercher les conditions optimales de séparation).

La détection est faite à 220 et 261 nm. Le produit A est séparé en 12 fractions matérialisées au niveau du chromatogramme (à 220 nm) par 12 pics ou groupe de pics, ainsi que de très petits pics (figure 13). Le nombre de pics est moindre à 261 nm car certaines fractions n'absorbent pas à cette longueur d'onde. Les fractions obtenues sont non colorées (A1, A2, A2.1, A2.2, A4.1), jaune pâle (A6), jaune clair (A7, A8), jaune vif (A3, A5.1) ou jaune très vif (A4 et A5). Ces deux derniers (qui absorbent plus à 261 nm) sont les produits majoritaires.

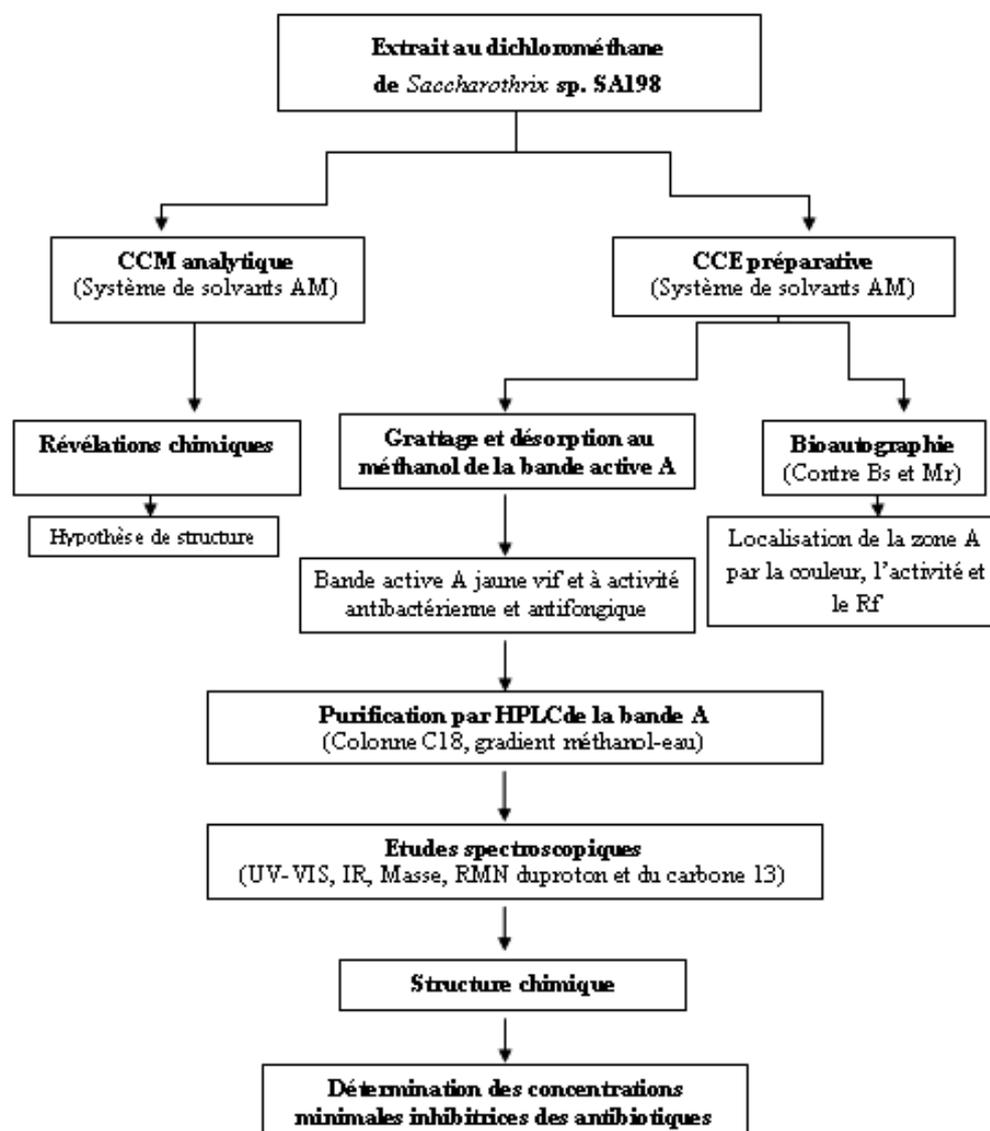


Figure 12. Résultat montrant la procédure de purification et de caractérisation des antibiotiques de *Saccharothrix* sp. SA198.

AM, acétate d'éthyle-méthanol (100-15, v/v); Bs, *Bacillus subtilis*; Mr, *Mucor ramannianus*; CCE, chromatographie sur couche épaisse de gel de silice.

4.1.3.2.- Activités antibiotiques des produits purifiés par HPLC

L'activité des fractions collectées a été déterminée par antibiographie (disques de papier de 6 mm de diamètre) contre *B.subtilis* (10 µl par disque) et *M. ramannianus* (20µl par disque) (tableau 17).

Aucune des fractions non colorées n'est active. En revanche, toutes les fractions colorées en jaune sont actives. Les composés A4 (temps de rétention = TR = 18,7 min) et A5 (TR = 21,8 min), de couleur jaune très vif, sont les plus actifs. Ils présentent une activité à la fois antibactérienne et antifongique, tout comme les composés A3, A5.1 et A7. Le produit A6 est faiblement antifongique et le produit A8 est essentiellement antibactérien. Les autres pics, très petits et non numérotés, sont tous inactifs.

Cependant, comme le profil est très chargé en pics (notamment à 220 nm) et dans le but de faciliter les purifications, nous avons procédé à un petit traitement du produit semi-pur A avant de l'analyser par HPLC.

4.1.3.3.- Purification après lavage au dichlorométhane et solubilisation dans du méthanol

Le produit semi-pur A a été séché (bien sec) dans un pilulier. Il a été lavé par du dichlorométhane. Celui-ci (très peu coloré) a été éliminé. Le résidu (non soluble avec le dichlorométhane, et de couleur brun foncé) a été solubilisé entièrement dans du méthanol, puis injecté par HPLC.

Le profil obtenu (figure 14) est très net, dans le sens où l'on obtient uniquement les composés majoritaires A4 et A5 (et aussi A5.1), en plus de A1 (qui est un mélange de méthanol et d'impuretés hydrophiles inactives). A4 et A5 n'ont pas été solubilisés à sec par le dichlorométhane (une vérification par HPLC a été effectuée).

Pour la suite de notre étude, nous avons entrepris de purifier les composés majoritaires (les plus actifs) A4 et A5, ainsi que le produit A5.1. Après une seconde (et parfois une troisième) réinjection, nous avons pu purifier ces composés (figures 15 et 16).

Produit	Couleur	Activité (Diamètre d'inhibition en mm)		Temps de rétention (min)
		<i>E. subtilis</i>	<i>M. ramannianus</i>	
A1	Non coloré	NA	NA	6,0
A2	Non coloré	NA	NA	7,0 à 14,0
A2.1	Non coloré	NA	NA	16,3
A2.2	Non coloré	NA	NA	16,7
A3	Jaune vif	20	22	17,7
A4	Jaune très vif	20	36	18,7
A4.1	Non coloré	NA	NA	19,7
A5.1	Jaune vif	16	30	20,8
A5	Jaune très vif	22	36	21,8
A6	Jaune pâle	NA	10	25,6
A7	Jaune clair	25	10	29,7
A8	Jaune clair	25	NA	32,1

Tableau 17. Activités des fractions purifiées par HPLC du produit A solubilisé dans du méthanol de *Saccharothrix sp. SA198*.

NA, non actif. Les diamètres d'inhibition comprennent celui du disque qui est de 6 mm.

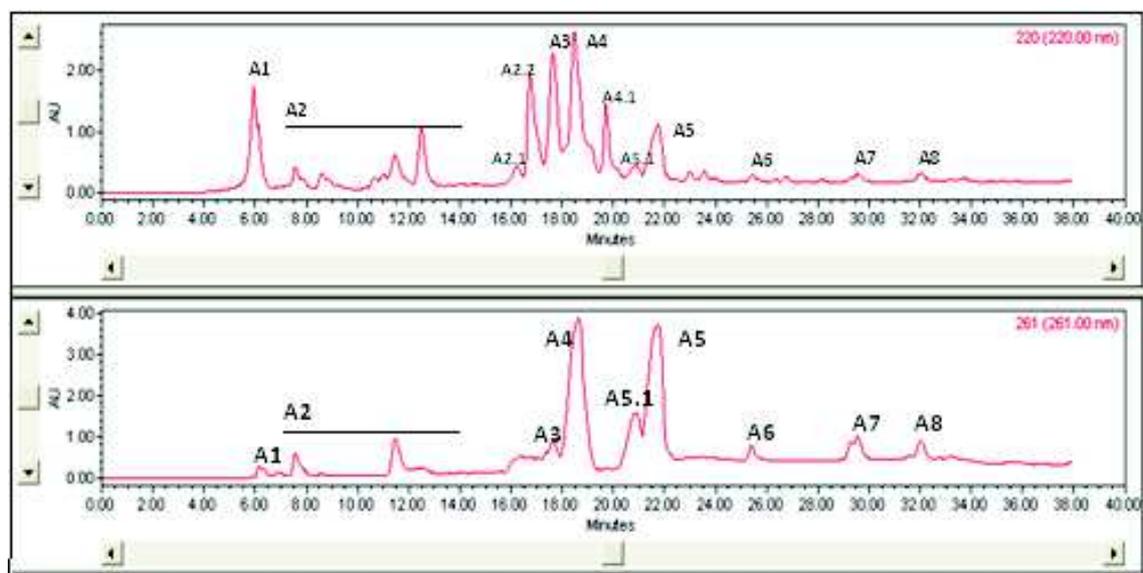


Figure 13. Profil d'élution de la première injection du produit Ade *Saccharothrix* sp. SA198 solubilisé auparavant dans du méthanol.

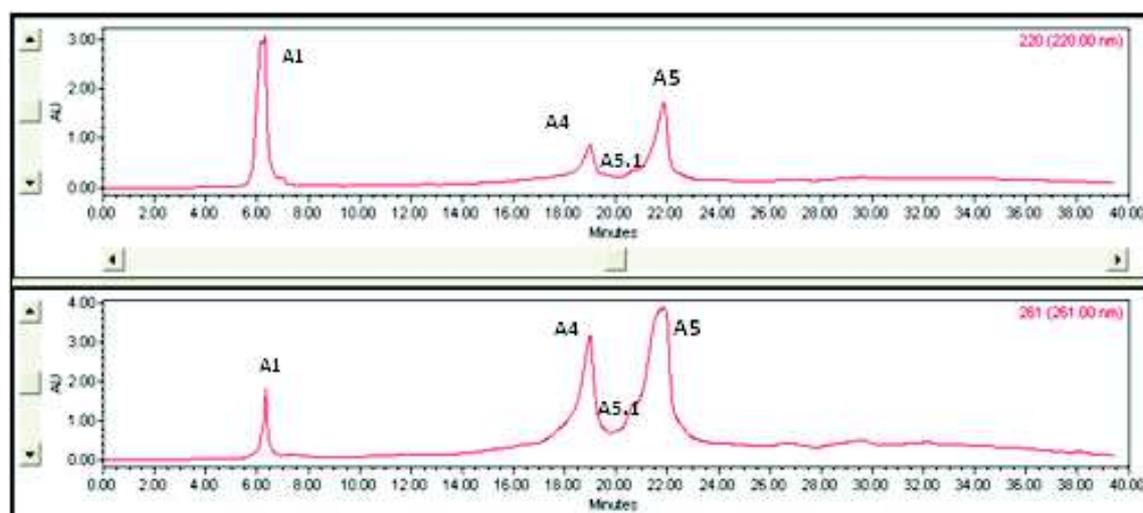


Figure 14. Profil d'élution de la première injection du produit Ade *Saccharothrix* sp. SA198 lavé auparavant par du dichlorométhane puis solubilisé dans du méthanol.

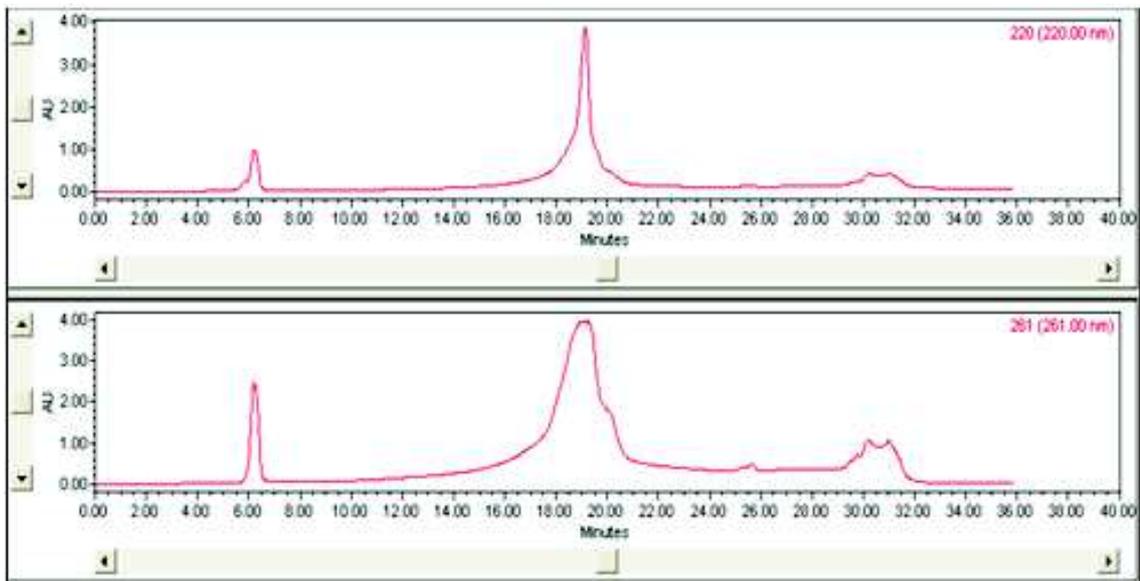


Figure 15. Profil d'élution de la réinjection du produit A4 de *Saccharothrix* sp. SA198 lavé auparavant par du dichlorométhane puis solubilisé dans du méthanol (purification en cours).

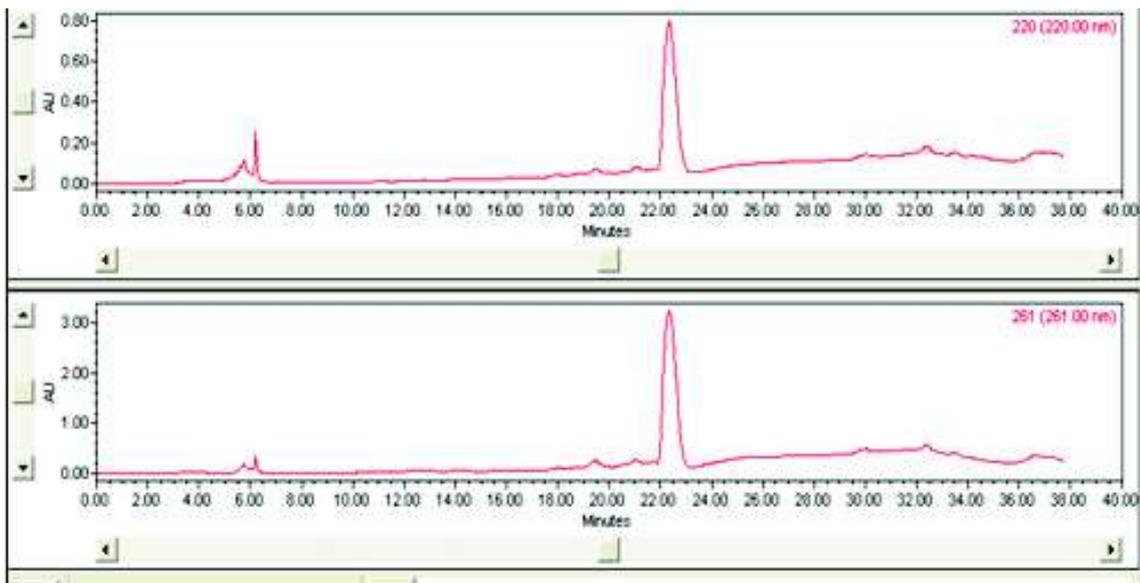


Figure 16. Profil d'élution de la réinjection du produit A5 de *Saccharothrix* sp. SA198 lavé auparavant par du dichlorométhane puis solubilisé dans du méthanol (purification finale).

4.2.- Discussion

Le produit A semi-pur de *Saccharothrix* SA198, récolté en une seule zone active à $R_f = 0,37$ après chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice, s'est révélé être, après analyse par HPLC, un complexe de plusieurs composés dont sept, de couleur jaune, ont une activité antimicrobienne. Ceci rappelle le cas de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137^T (Lamari *et al.*, 2002a,b,) dont les zones actives AJ et PS, de couleur jaune, contiennent respectivement trois et sept antibiotiques proches entre eux et appartenant tous au groupe

des dithiopyrrolones, à activité antifongique et antibactérienne. Il se pourrait également que les antibiotiques jaunes de *Saccharothrix* sp. SA198 soient également proches entre eux et appartenant à une même famille. Ces antibiotiques, dont les majoritaires sont A4 et A5, sont comme les dithiopyrrolones de *S. algeriensis*, antifongiques et antibactériens, à l'exception de A8 (antibactérien uniquement) et A6 (antifongique uniquement).

Le profil d'éluion par HPLC du produit A semi-pur, solubilisé dans du méthanol, est relativement net (sans trop de contaminants inactifs). C'est souvent le cas lorsque l'extraction du filtrat de culture est effectuée par le dichlorométhane, comme il a été rapporté dans les travaux précédents de notre laboratoire (Lamari, 2002a; Zitouni, 2005; Merrouche, 2000). Ce profil est devenu encore plus net lorsque le produit A semi-pur et très bien séché est lavé auparavant par du dichlorométhane puis solubilisé dans du méthanol avant d'être analysé par HPLC. En effet, cette procédure élimine presque tous les composés et laisse les antibiotiques A4, A5 et A5.1. Cependant, il faut signaler que ces trois produits, une fois secs, deviennent insolubles au dichlorométhane, alors que ce solvant a permis leur extraction (liquide-liquide) quand ils étaient dans le produit brut A contenu dans le filtrat de culture.

Toujours est-il que cette méthode a permis de faciliter beaucoup la purification totale des antibiotiques A4, A5 et A5.1 qui ont fait l'objet de révélations chimiques et d'analyses spectroscopiques (UV-visible, Infra-Rouge, masse et RMN du proton et du carbone 13) en vue de déterminer leur structure chimique, ainsi que de la détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices contre un certain nombre de microorganismes-cibles.

5.- Etudes physico-chimiques et spectroscopiques des antibiotiques

5.1.- Résultats

5.1.1.- Réactions chromogéniques

Parallèlement aux bioautographies, des plaques similaires de CCM ont fait l'objet de révélations chimiques.

La fraction active A semi-purifiée, ainsi que les trois produits purifiés (A4, A5 et A5.1) ont donné une réaction positive uniquement avec le formaldéhyde- H_2SO_4 (révélateur des aromatiques polycycliques). Les réactions sont par contre négatives avec la ninhydrine, le chlorure de fer ferrique, l'anisaldéhyde- H_2SO_4 et lenaphtorésosorcinol- H_2SO_4 .

Ceci laisse supposer que la fraction active A, ainsi que les trois produits purifiés (A4, A5 et A5.1) contiennent des aromatiques polycycliques, mais ne contiennent pas de sucres, de fonction amine, de phénol et d'acides hydroxamiques.

5.1.2.- Spectroscopie en UV-visible

Le spectre d'absorption dans l'UV-visible du produit semi-pur A (figure 17) montre la présence de trois maxima d'absorption: 308, 261 et 307 nm.

Les spectres UV-visibles des produits purs A4, A5 (figure 18) et A5.1 présentent la même allure et possèdent deux pics d'absorption maximale, à 262 nm et à 343 nm pour A4 et à 263 et 343 nm pour A5 et A5.1. Ceci laisse penser qu'on est en présence de trois molécules qui ont une structure chimique très proche.

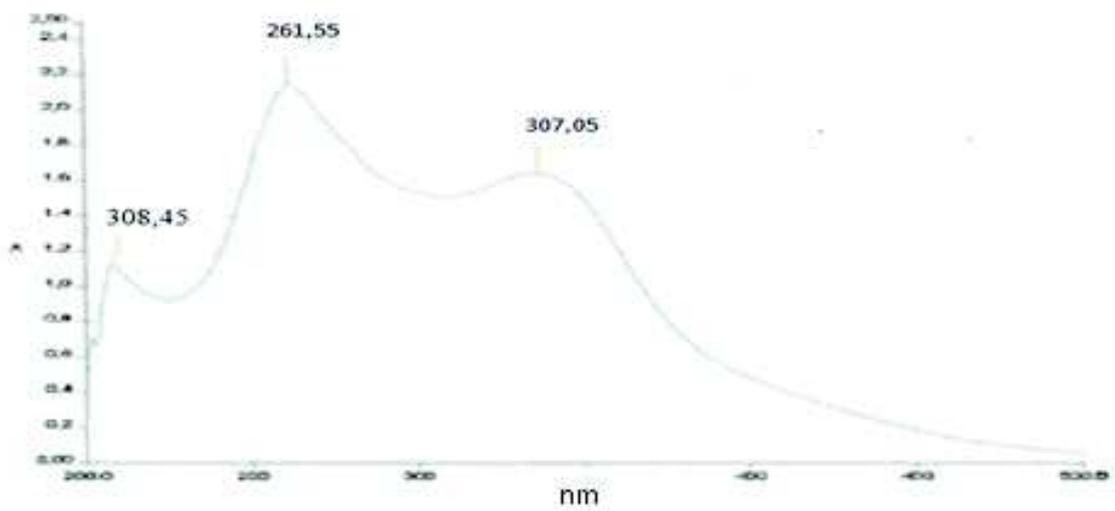


Figure 17. Spectre d'absorption dans l'UV-visible de la fraction semi-pure A solubilisée dans du méthanol.

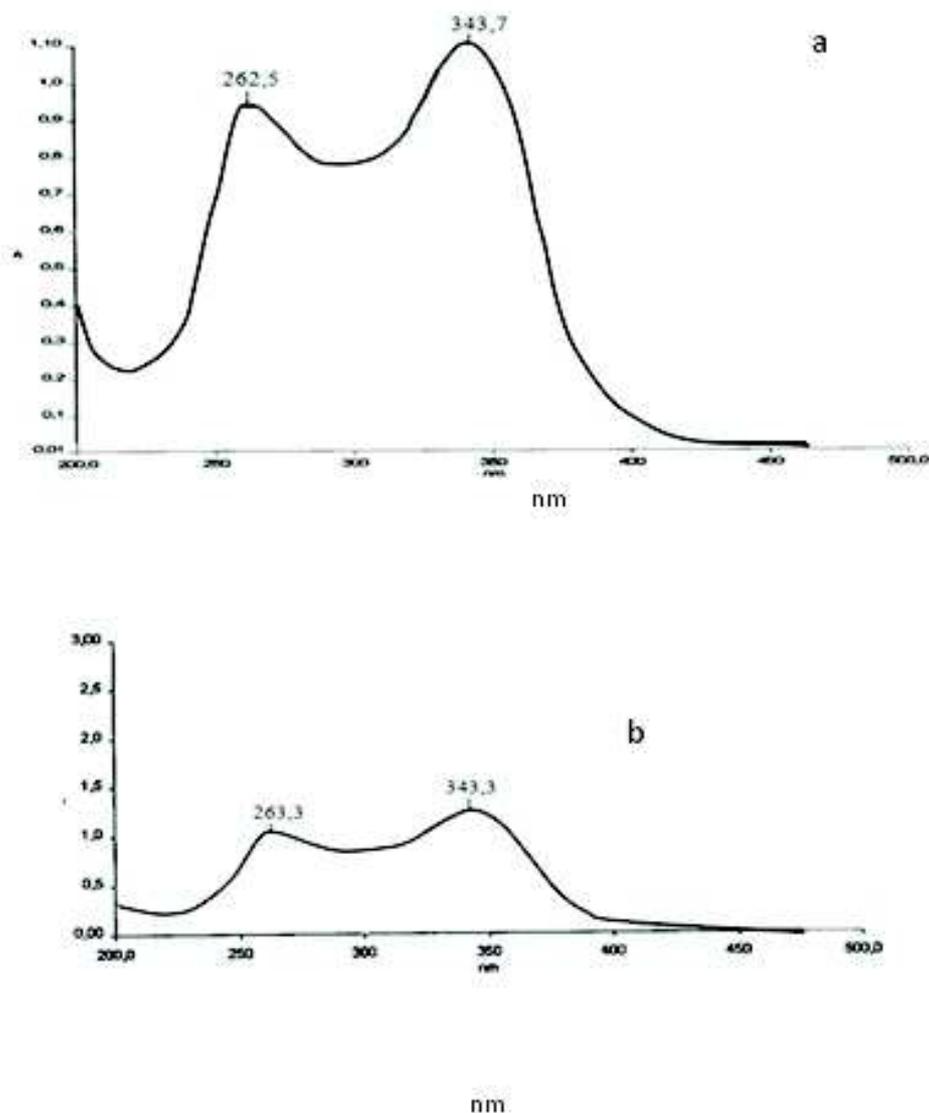


Figure 18. Spectre d'absorption dans l'UV-visible des produits purs A4 (a) et A5 (b) solubilisés dans du méthanol. Le produit A5.1 possède le même spectre que A5.

5.1.3.- Spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges ont été réalisés pour les produits purs A4 et A5 (figures 19 et 20). Ces spectres montrent des bandes d'absorption à $3323\text{--}3453\text{ cm}^{-1}$ indiquant la présence de fonctions hydroxyles (OH), à $2850\text{--}2951\text{ cm}^{-1}$ et à $1434\text{--}1464\text{ cm}^{-1}$ caractérisant la présence des groupement C-H (C-H aliphatique), à $1685\text{--}1735\text{ cm}^{-1}$, $1517\text{--}1634\text{ cm}^{-1}$ et $1151\text{--}1156\text{ cm}^{-1}$ caractérisant la présence des groupements C=O, C=C (des cycles aromatiques) et C-O, respectivement. La ressemblance entre ces molécules est ainsi confirmée.

5.1.4.- Spectrométrie de masse

La figure 21 représente les spectres de masse des antibiotiques A4 et A5, réalisés par nano-electrospray ionisation (mode négatif). Le mode négatif a permis d'obtenir des ions pseudomoléculaires $M-H = 505$ et $M-H = 519$, ce qui correspond donc à une masse moléculaire de 506 et 520 pour les antibiotiques A4 et A5, respectivement. L'antibiotique A5.1 possède la même masse que A5 (suggérant ainsi la possibilité d'un isomère).

La figure 22 représente les spectres de masse à haute résolution réalisés par nano-electrospray des antibiotiques A4 et A5. Des ions pseudomoléculaires $M + Na = 529,1819$ et $M + Na = 543,1983$ sont obtenus pour A4 et A5 respectivement. La masse de A4 est donc de $529 - 23$ (masse du sodium) = 506; celle de A5 est de $543 - 23 = 520$. Grâce à la technique de la masse à haute résolution, les formules chimiques des deux composés ont pu être déterminées comme étant $C_{29}H_{30}O_8$ (calculée 506,1838, trouvée 506,1819) et $C_{30}H_{32}O_8$ (calculée 520,1995, trouvée 520,1983) pour A4 et A5, respectivement. Ce dernier contient en plus un carbone et deux hydrogènes, donc probablement un CH_2 , par rapport à A4.

5.1.5.- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN du proton et du carbone 13 ont été réalisés pour les composés A4 et A5 (figures 23 et 24).

Les déplacements chimiques des 1H et ^{13}C des trois composés sont donnés dans le tableau 18 et les structures chimiques dans les figures 25, 26 et 27.

Les spectres du ^{13}C et HSQC montrent 29 signaux de carbone pour le composé A4 et 30 signaux de carbone pour A5 et A5.1.

D'après les données du ^{13}C , il a été possible de discerner plusieurs groupements communs entre les trois molécules:

- deux groupements cétoniques ($\delta_c 198,5$).
- deux groupements énoliques ($\delta_c 166,5$).
- un groupement carboxylate ($\delta_c 189,2$).
- un groupement hydroxyle ($\delta_c 71,0$).
- un groupement époxy ($\delta_c 52,5$ et $56,9$).
- 13 atomes de carbone hybrides sp^2 ($\delta_c 121,5$ à $150,5$).

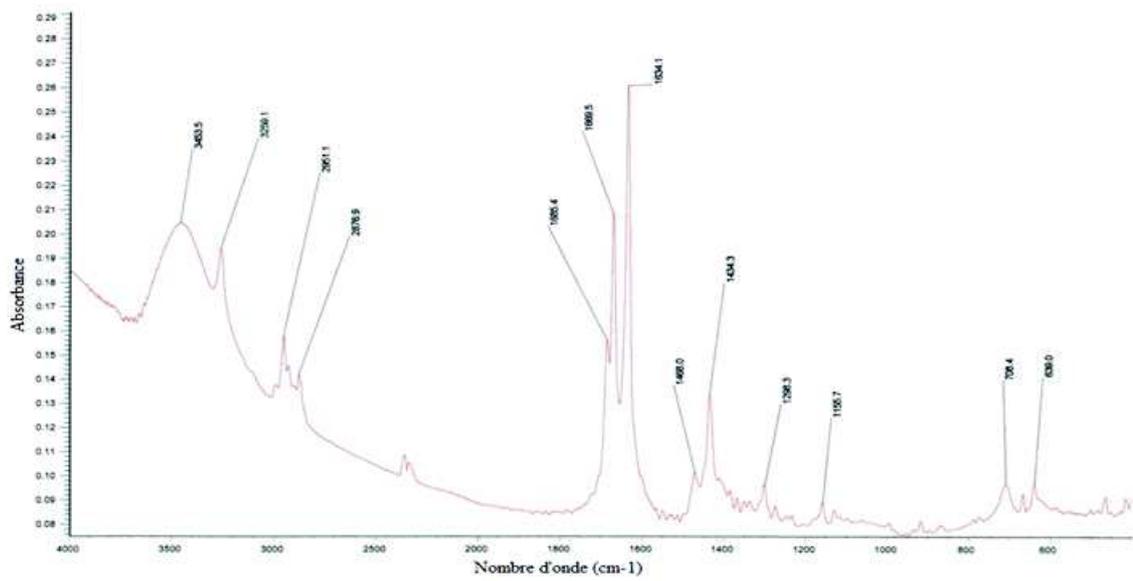


Figure 19. Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique A4 sécrété par *Saccharothrix* sp. SA198.

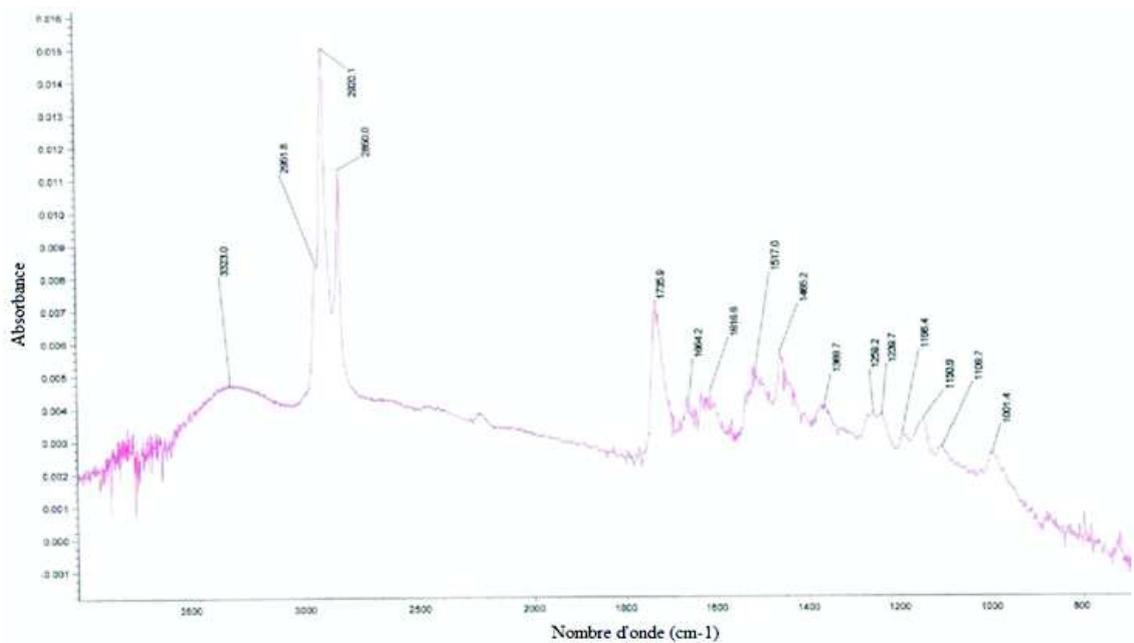


Figure 20. Spectre d'absorption dans l'infrarouge de l'antibiotique A5 sécrété par *Saccharothrix* sp. SA198.

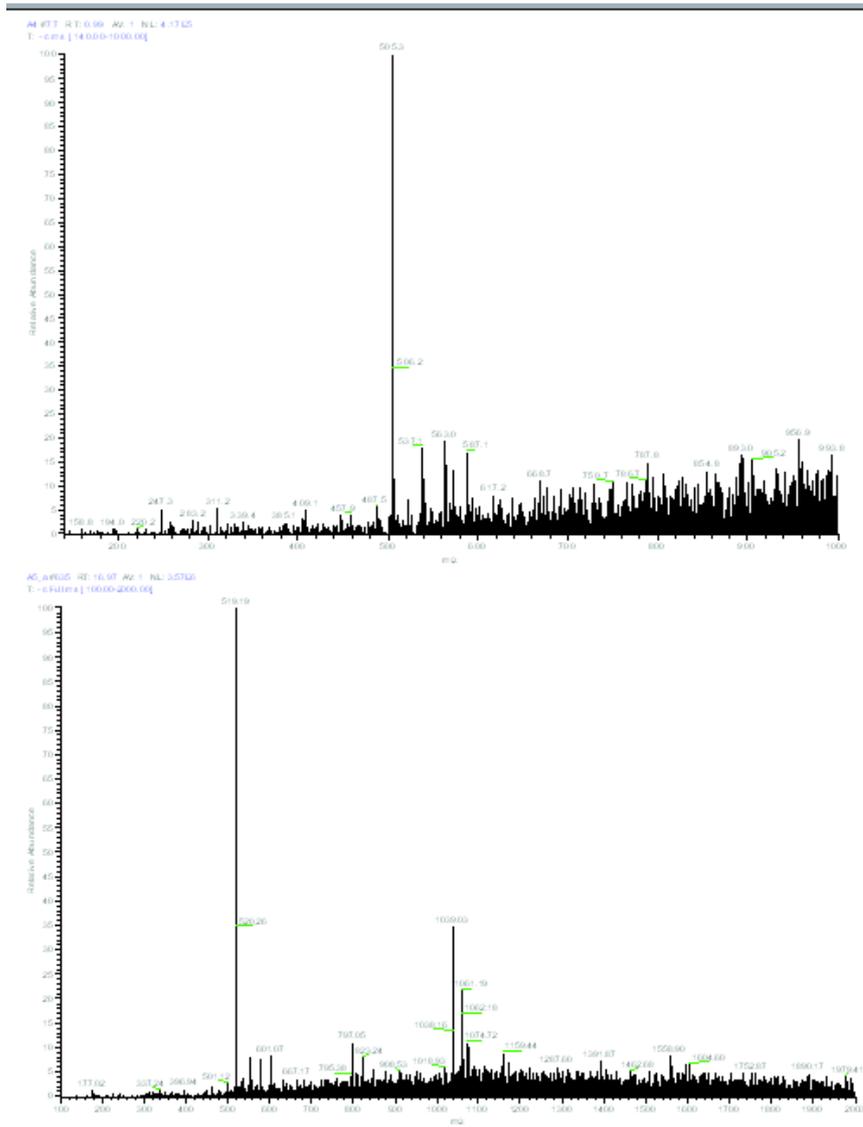


Figure 21. Spectres de masse des antibiotiques A4 (a) et A5 (b) (méthode Nano ESI en mode négatif) sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198.

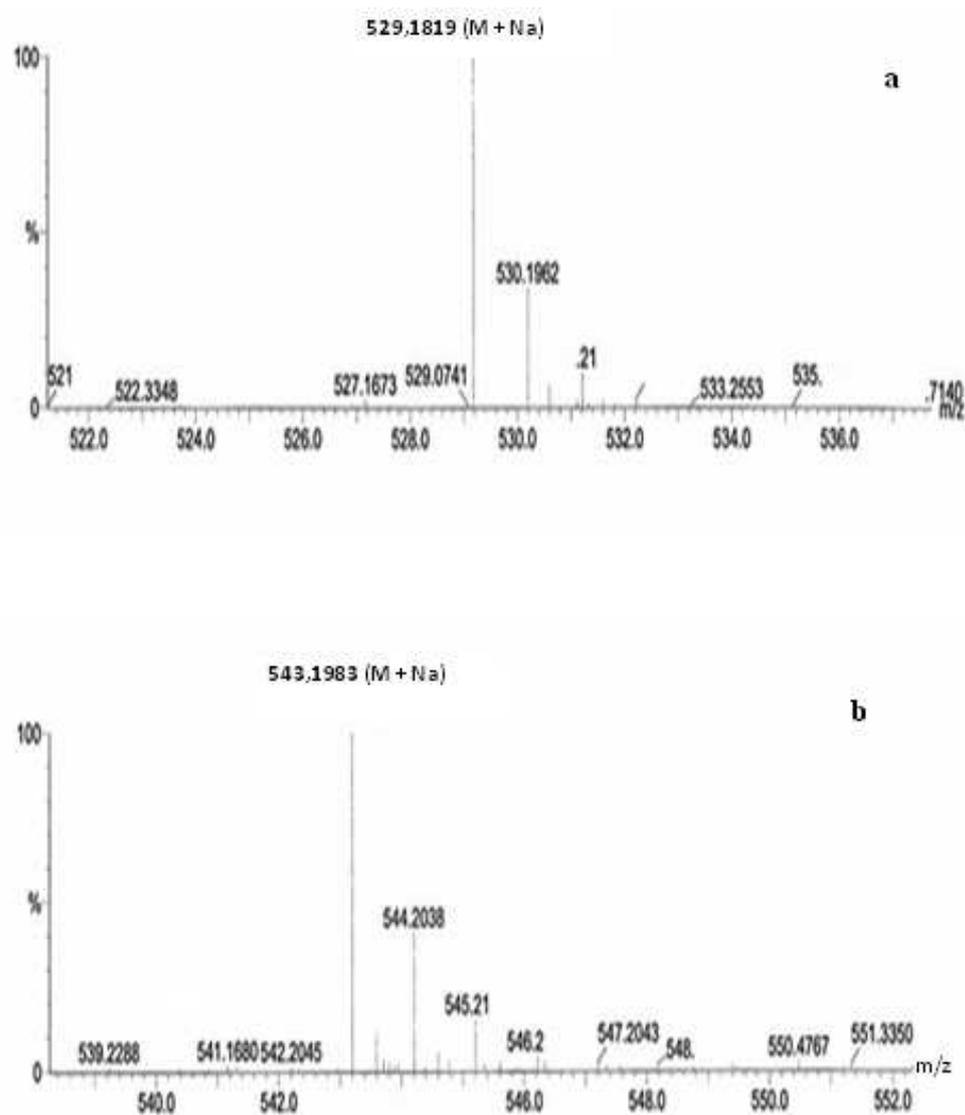


Figure 22. Spectres de masse à haute résolution des produits A4 (a) et A5 (b) secrétés par *Saccharothrix* sp. SA198.

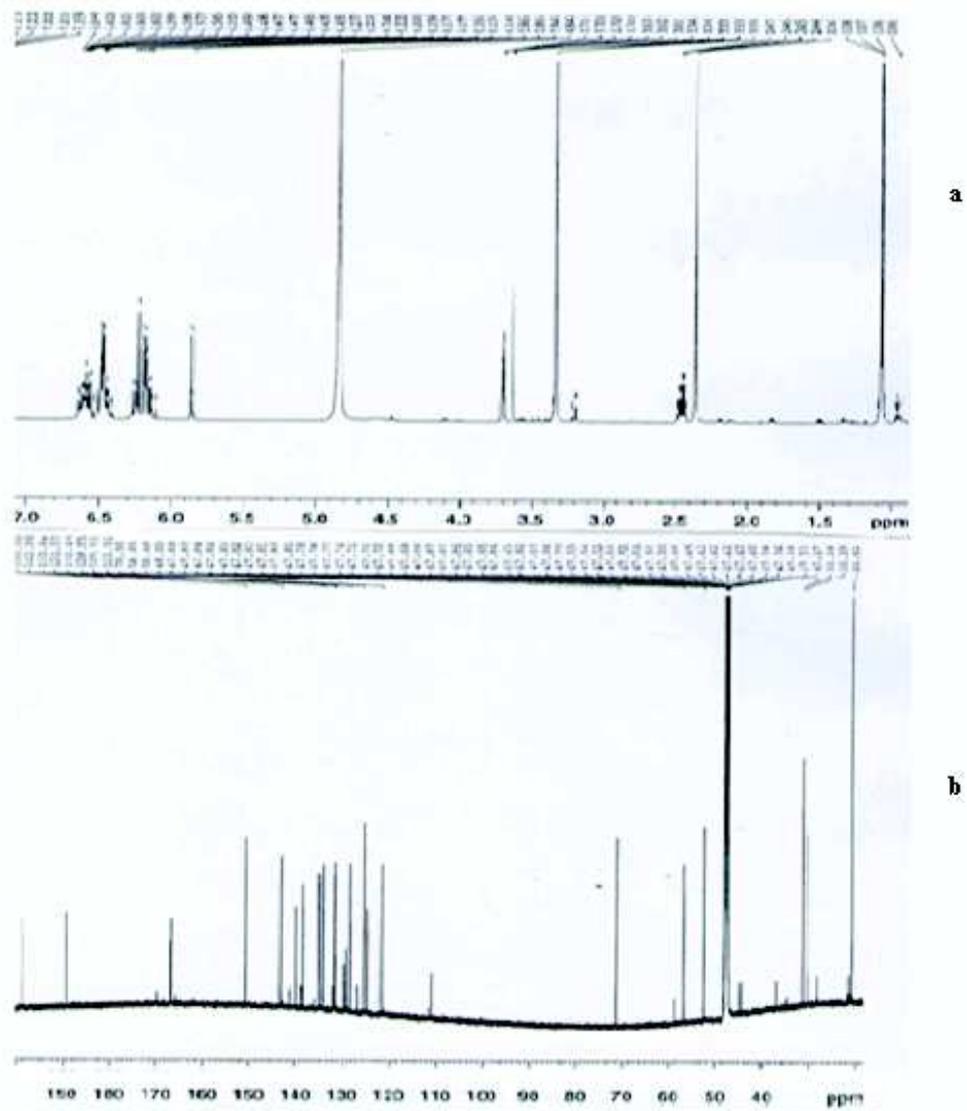


Figure 23. Spectres RMN du proton (a) et du carbone 13 (b) de l'antibiotique A4 sécrété par *Saccharothrix* sp. SA198.

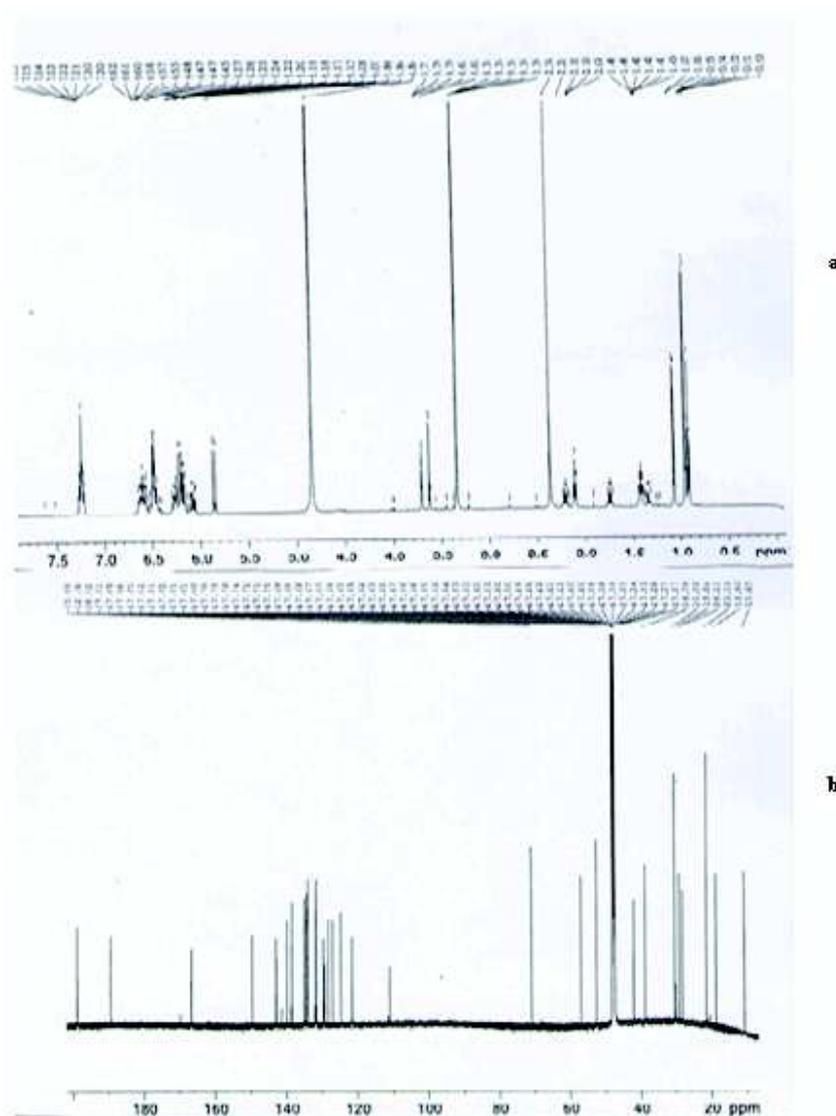


Figure 24. Spectres RMN du proton (a) et du carbone 13 (b) de l'antibiotique A5 sécrété par *Saccharothrix* sp. SA198.

De plus, cinq atomes de carbone hybride sp^3 (δ_c 20,8 à 31,4) pour le composé A4 et six atomes de carbone hybrides sp^3 (δ_c 10,7 à 38,8) pour les composés A5 et A5.1 ont été notés.

Les hydrogènes des groupements hydroxyle et énoles ne sont pas observés; ceci est dû à un échange rapide avec le MeOD (le méthanol deutérié utilisé dans la RMN).

L'analyse des spectres de la RMN 2D homonucléaire $^1H-^1H$ et hétéronucléaire $^1H-^{13}C$ en particulier celle du $^1H-^{13}C$, a permis d'établir la connectivité entre tous les groupements des molécules A4, A5 et A5.1 (figures 25, 26 et 27).

Les différents résultats spectroscopiques et spectrométriques (UV-visible, IR, masse, RMN du 1H et du ^{13}C), nous ont conduit à identifier la structure moléculaire des trois composés:

L'antibiotique A4 est le 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-methyl-hepta-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-acide carboxylique.

L'antibiotique A5 est le 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-methyl-octa-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-acide carboxylique.

L'antibiotique A5.1 est le 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-7-methyl-hepta-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-acidecarboxylique.

Les antibiotiques A5 et A5.1 sont des isomères de position et possèdent un CH₂ en plus par rapport à A4. Ce sont des composés qui contiennent deux cycles (dont l'un contient un groupement époxy) et deux chaînes insaturées non cycliques. Les trois antibiotiques contiennent chacun huit doubles liaisons conjuguées (octaène).

5.2.- Discussion

Les révélations chimiques des antibiotiques A4, A5 et A5.1 suggèrent la présence de cycle aromatique et l'absence de sucres, d'acides aminés, de phénol et d'acides hydroxamiques.

Les maxima d'absorption dans l'UV et les spectres infrarouges montrent que ces antibiotiques sont des composés insaturés qui contiennent des aromatiques et peut être également des doubles liaisons conjuguées. Ces spectres montrent aussi que l'on est en présence d'antibiotiques appartenant à une même famille et à structure chimique très proche.

Nombre de ^1H et ^{13}C	Déplacement chimique du ^1H , ppm			Déplacement chimique du ^{13}C , ppm		
	A4	A5	A5.1	A4	A5	A5.1
1	3,62	3,62	3,62	52,5	52,5	52,5
2	3,69	3,70	3,70	56,9	56,9	56,9
3	-	-	-	71,0	71,0	71,0
4	7,22	7,22	7,22	129,2	129,1	129,1
5	-	-	-	128,1	128,1	128,1
6	-	-	-	189,2	189,2	189,2
7	5,84	5,85	5,85	134,9	134,9	134,9
8	6,57	6,58	6,58	131,5	131,5	131,5
9	6,48	6,48	6,48	134,3	134,3	134,3
10	6,46	6,47	6,47	133,9	133,9	133,9
11	6,61	6,61	6,61	138,4	138,3	138,3
12	6,47	6,47	6,47	131,6	131,6	131,6
13	7,23	7,22	7,22	139,7	139,7	139,7
14	6,21	6,21	6,21	124,6	124,6	124,6
15-22	-	-	-	166,5	166,5	166,5
16-21	-	-	-	110,7	110,8	110,8
17-20	-	-	-	198,5	198,5	198,5
18-19	2,36	2,36	2,36	30,4	30,3	30,3
23	6,18	6,17	6,18	121,5	121,4	121,4
24	7,21	7,22	7,23	142,9	142,9	142,8
25	6,24	6,25	6,26	125,6	126,9	129,5
26	6,15	6,06	6,18	150,5	149,5	142,8
27	2,45	2,21	2,11	31,4	38,8	41,97
28	1,08	1,07	1,74	20,8	18,6	28,15
29	1,08	1,42	0,95	20,8	29,00	21,28
30	-	0,91	-	-	10,7	-

Tableau 18. RMN du ^1H et du ^{13}C des antibiotiques A4, A5 et A5.1 solubilisés dans le CD_3OD (chloroforme deutérié) à 298K, secrétés par *Saccharothrix* sp. SA198.

Note: voir les figures 25, 26 et 27 pour la numérotation des atomes d'hydrogène et de carbone.

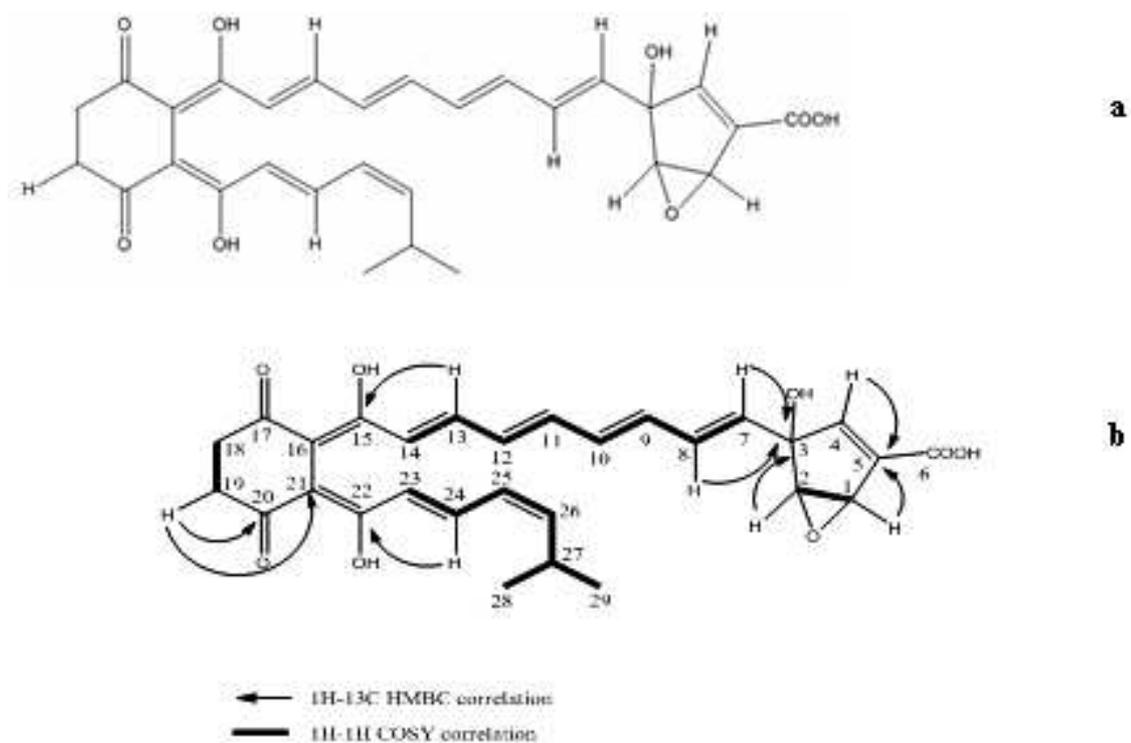


Figure 25. Structure de l'antibiotique A4 (a), et corrélations HMBC et COSY (b).

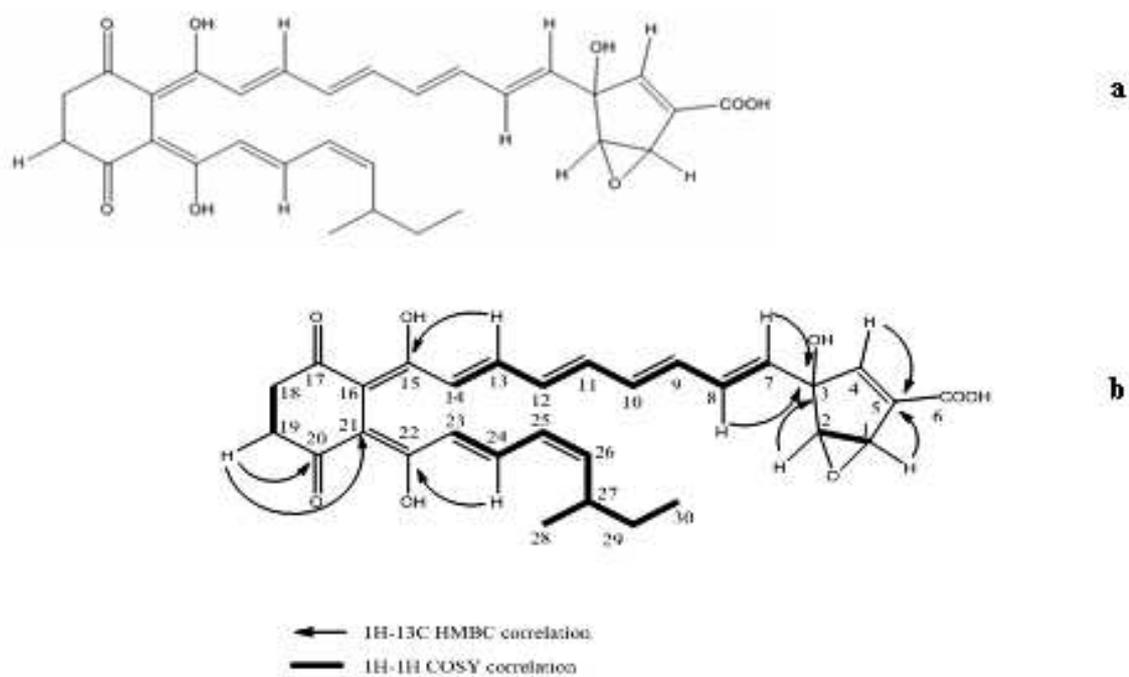


Figure 26. Structure de l'antibiotique A5 (a), et corrélations HMBC et COSY (b).

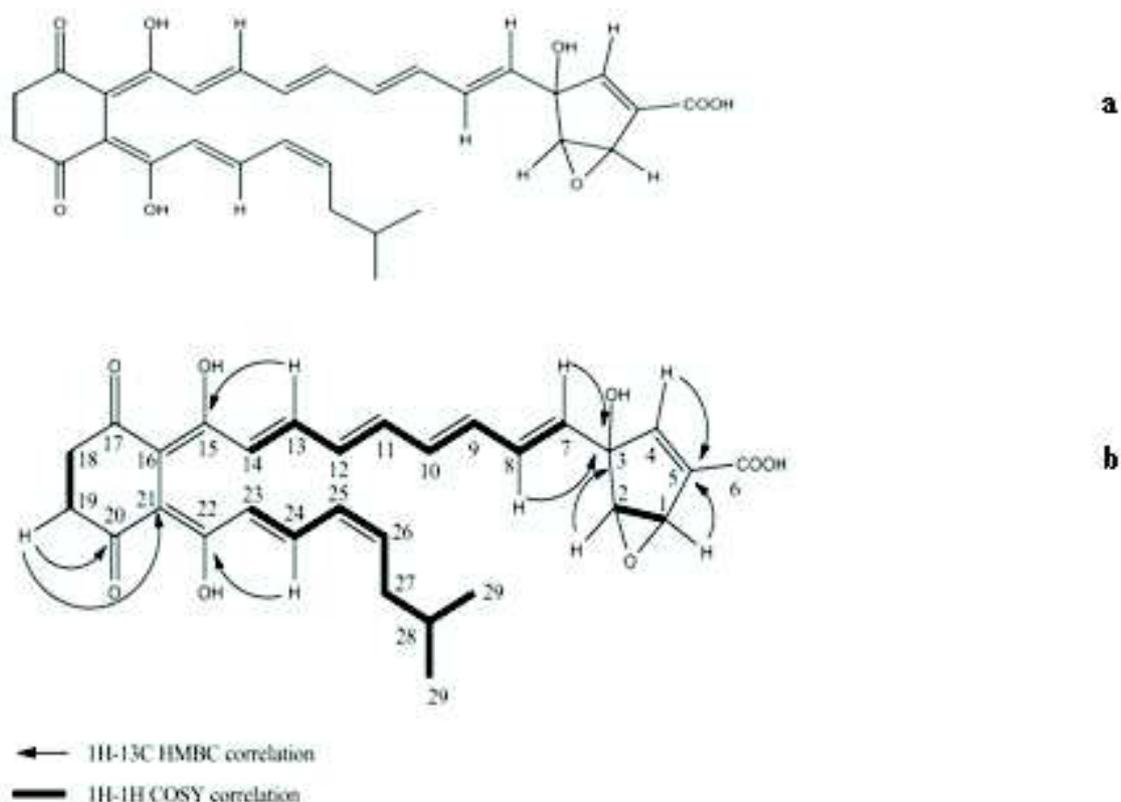


Figure 27. Structure de l'antibiotique A5.1 (a), et corrélations HMBC et COSY (b).

Les spectres de masse nous ont permis d'obtenir les poids moléculaires des composés A4 (506), A5 et A5.1 (520). Ces deux derniers, ayant le même poids moléculaire, semblent être des isomères de position et diffèrent apparemment de A4 que par un CH_2 .

La masse à haute résolution a permis de confirmer les résultats précédents tout en donnant les formules chimiques brutes des antibiotiques A4 ($\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_8$) et A5 ($\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_8$).

La RMN du ^{13}C a permis d'avoir le nombre exact d'atomes de carbone dans chaque molécule. Celui-ci est de 29 pour A4 et de 30 pour A5 et A5.1.

Les RMN et les corrélations HMBC et COSY, combinées à la masse ont permis d'aboutir à la structure chimique des trois antibiotiques, qui sont très proches entre eux, qui contiennent des groupements et fonctions cétone, hydroxyle, carboxylique (présence de COOH), époxy et enole, ainsi que deux cycles. La présence de deux isomères de position (A5 et A5.1), ainsi que la différence d'un CH_2 avec A4 est ainsi confirmée.

Les structures chimiques sont respectivement:

- Pour A4: 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-méthyl-hepta-2,4-dienylidène)-3,6-dioxo-cyclohexylidène]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène-2-acide carboxylique.
- Pour A5: 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-méthyl-octa-2,4-dienylidène)-3,6-dioxo-cyclohexylidène]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène-2-acide carboxylique.

- Pour A5.1: 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-7-méthyl-hepta-2,4-dienylidène)-3,6-dioxo-cyclohexylidène]-nona-1,3,5,7-tetraényl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène-2-acide carboxylique.
- Ces antibiotiques contiennent dans leur structure des doubles liaisons conjuguées, au nombre de huit (octaènes). Ce sont donc des composés polyéniques. Mais ils diffèrent des macrolides polyéniques dont les doubles liaisons constituent la partie hydrophobe d'un grand cycle lactone (macrolactone) (Berdy *et al.*, 1987). Ils diffèrent aussi des macrolides polyéniques par leur activité à la fois antibactérienne et antifongique, les autres étant uniquement antifongiques (Bycroft, 1988).

Les structures chimiques ont tout d'abord été comparées à celles des molécules bioactives sécrétées par les souches et espèces de *Saccharothrix* et qui sont toutes différentes. En effet, les représentants de ce genre sont connus pour la sécrétion d'antibiotiques appartenant à la famille des aminoglycosides et des benzoquinones (Takahashi *et al.*, 1986), des glycopeptides (Takeuchi *et al.*, 1992), des nucléosides carboxyliques (Bush *et al.*, 1993), des dithiopyrrolones (Lamari *et al.* 2002a,b), des heptadécaglycosides (Singh *et al.* 2000), des anthracyclines (Zitouni *et al.*, 2004b,c), des macrolides (Zitouni, 2005; Murakami *et al.*, 2009), des angucyclines (Kalinovskaya *et al.*, 2010) et des dérivés de phtalates (Johnson *et al.*, 2012).

La recherche de composés similaires décrits dans la littérature s'est poursuivie en consultant les dictionnaires des produits bioactifs de Berdy *et al.* (1987), Bycroft (1988), Buckingham (1997) et Berdy (2005), ainsi que les bases de données sur les structures des antibiotiques existants, telles que chemspider (www.chemspider.com) et surtout sciencefinder (www.sciFinder.com) qui est une base assez complète.

Aucune molécule bioactive connue ne ressemble aux trois antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198, lesquels peuvent donc être considérés comme étant de nouveaux antibiotiques.

6.- Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques

6.1.- Résultats

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a été réalisée pour les trois antibiotiques purifiés, à savoir, A4, A5 et A5.1. Elle a été réalisée sur six bactéries, six champignons et deux levures. La plupart d'entre eux sont phytopathogènes ou pathogènes ou toxigènes pour l'homme.

Les résultats des CMI sont consignés dans le tableau 19.

Les antibiotiques A5 et A5.1 possèdent la même activité. Cette activité est en général plus puissante que celle de A4 contre les champignons filamenteux et plus ou moins équivalente contre les bactéries.

Les trois antibiotiques ont montré une forte activité contre les champignons filamenteux tels que *Penicillium expansum* (CMI: 2 µg/ml), *Mucor ramannianus* (1-5 µg/ml) et *Aspergillus carbonarius* (2-10 µg/ml). Elle est appréciable à modérée pour les trois autres champignons testés. Cette activité est aussi appréciable contre *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis* (Gram positif) et moyenne contre *Listeria monocytogenes* (Gram positif), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (Gram négatif), cette dernière étant la

moins sensible. Les deux levures testées (*Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*) se sont montrées résistantes.

6.2.- Discussion

Les résultats des CMI ont montré que les trois antibiotiques possèdent une activité globalement assez intéressante et qui est particulièrement forte contre certains champignons toxigènes (*Penicillium expansum*, *Aspergillus carbonarius*) ou pathogène (*Mucor ramannianus*) pour l'homme. Les isomères A5 et A5.1 possèdent la même activité laquelle diffère parfois avec celle de A4. La comparaison des CMI obtenues chez certaines souches et espèces de *Saccharothrix*, notamment celles issues de notre laboratoire, montre que:

- L'activité antimicrobienne des antibiotiques de *Saccharothrix* sp. SA198 est meilleure que celle des mutactimycines et des macrolides sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA103 (Zitouni *et al.*, 2004b; Zitouni, 2005).
- Cette activité est meilleure, équivalente ou moins bonne que celles des dithiopyrrolones sécrétées par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (Lamari, 2002a; Merrouche *et al.*, 2010 et 2011), et ce, selon la dithiopyrrolone considérée.
- L'activité antibactérienne est moins bonne que celle du chloramphénicol sécrété par *Saccharothrix* sp. PAL54 (Aouiche *et al.*, 2012), mais l'activité antifongique est meilleure (le chloramphénicol étant inactif contre les champignons).

Dans la littérature, et en dehors des travaux de notre laboratoire, plusieurs souches ou espèces de *Saccharothrix* sont rapportées pour sécréter des antibiotiques à activité uniquement antibactérienne (Brazhnikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979). D'autres possèdent des activités antifongiques, avec ou sans activités antibactériennes (Takahashiet *al.*, 1986; Sugawara *et al.*, 1999). Enfin, d'autres possèdent des activités diverses, comme par exemple, des activités antitumorales (Kimet *al.*, 1991; Seto *et al.*, 1992; Murakami *et al.*, 2001; Vertesy *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2012), antiparasitaires (Perry *et al.*, 1990), herbicides (Bush *et al.*, 1993), analgésiques (Tsuboya *et al.*, 1996) et anticholestérolémique (Matsuo *et al.*, 2003).

Microorganismes-cibles	Antibiotiques (µg/ml)	
	A4	A5 et A5.1
<i>Bacillus subtilis</i>	20	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	30	30
<i>Escherichia coli</i>	20	30
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	30
<i>Ascochyta fabae</i>	20	10
<i>Aspergillus carbonarius</i>	10	02
<i>Fusarium culmorum</i>	40	20
<i>F. equiseti</i>	30	30
<i>Mucor ramannianus</i>	05	01
<i>Penicillium expansum</i>	02	02
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>100	>100
<i>Candida albicans</i>	>100	>100

Tableau 19. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques A4, A5 et A5.1 sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198.

CONCLUSION GENERALE

Beaucoup d'antibiotiques, parmi les plus connus et utilisés, sont secrétés par les actinomycètes. Il s'agit notamment de la novobiocine, l'amphotéricine B, la vancomycine, la néomycine, la gentamicine, le chloramphénicol, la tétracycline, l'érythromycine, la nystatine, etc. Cependant, l'apparition de nouvelles maladies infectieuses, le nombre croissant des cas de résistance à certains antibiotiques et la toxicité de certains d'entre eux, suscitent un besoin urgent pour rechercher de nouveaux antibiotiques. Devant cette émergence, plusieurs stratégies de recherche ont été développées afin de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques. L'une d'elle vise la recherche de souches appartenant à des genres d'actinomycètes rares ou peu fréquents (autres que le genre *Streptomyces*) et provenant d'écosystèmes extrêmes et particuliers.

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de notre travail de recherche qui vise à identifier des actinomycètes rares d'origine saharienne et d'étudier les antibiotiques qu'ils produisent.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de trois souches d'actinomycètes, SA152, SA181 et SA198 isolées des sols sahariens.

L'étude taxonomique basée sur les critères morphologiques et chimiques (forme isomérique de l'acide diaminopimélique, sucres taxonomiquement importants, phospholipides, acides gras et ménaquinones) a permis d'assigner les trois souches au genre *Saccharothrix*.

Du point de vue cultural et physiologique, ces souches diffèrent entre elles et des espèces connues de *Saccharothrix*, suggérant la présence de trois espèces distinctes.

Une étude moléculaire portant sur le séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S a permis de confirmer l'appartenance de ces trois souches au genre *Saccharothrix*, déjà défini sur la base des critères morphologiques et chimiques. Les taux de similarité comparés avec les espèces les plus proches laissent supposer la présence d'espèces originales. Des taux de similitude de 99,3 et 98,9% ont été notés pour la souche SA152 avec *S. xinjiangensis* NBRC 101911^T et *S. texasensis* NRRL B-16107^T, les espèces les plus proches phylogénétiquement. La souche SA181 a montré des taux de similarité de 99,0, 98,9 et 98,4% avec les espèces les moins différentes, *S. longispora* NRRL B-116116^T, *S. yanglingensis* Hhs.015^T et *S. xinjiangensis* NBRC 101911^T, respectivement. Les pourcentages de similarité les plus élevés enregistrés pour la souche SA198 sont observés avec *S. australiensis* NRRL 11239^T et *S. algeriensis* NRRL B-24137^T, (98,8 et 98,6% respectivement).

Une hybridation ADN-ADN réalisée pour les souches SA181 et SA152 avec les espèces les plus proches a confirmé leur appartenance à de nouvelles espèces auxquelles ont été nommées *Saccharothrix hoggarensis*, pour SA181, et *Saccharothrix saharensis*, pour SA152. Les séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S de SA181 et SA152 ont été déposées au niveau de la GenBank sous les numéros d'accès HQ399564 et FJ 379333 respectivement. Les souches, quant à elles, ont été déposées dans deux collections mondiales, la DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures,

Inhoffenstraße 7B, Braunschweig, Allemagne) sous les numéros DSM 45457^T et DSM 45456^T, et la CCUG ([Culture Collection](#), [University of Göteborg, Suède](#)) sous les numéros 60214^T et 60213^T, respectivement. Elles constituent les souches-types de *S. hoggarensis* et *S. saharensis*.

Concernant l'isolat SA198, les caractéristiques phénotypiques (morphologiques et physiologiques) et moléculaires (séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S) suggèrent fortement la présence d'une nouvelle espèce, qu'il s'agira cependant de confirmer par une hybridation ADN-ADN avec *S. australiensis* et *S. algeriensis*.

Les souches SA198, SA181 et SA152 de *Saccharothrix* ont fait également l'objet d'une étude de leurs activités antimicrobiennes par la méthode des stries croisées. Les trois souches ont montré un spectre d'action relativement assez large, qui s'étend aussi bien sur les bactéries à Gram positif et Gram négatif que sur les champignons filamenteux et les levures. Plusieurs microorganismes-cibles testés sont phytopathogènes ou pathogène ou toxigènes pour l'homme.

Saccharothrix sp. SA198, qui a présenté les meilleures activités antagonistes, a été sélectionnée pour une étude détaillée de ses antibiotiques.

Une cinétique de production d'antibiotiques a été menée en fioles d'Erlenmeyers sur les milieux de culture ISP2 et Bennett, en utilisant *Bacillus subtilis*, *Aspergillus carbonarius* et *Mucor ramannianus* comme germes-cibles. Les résultats ont montré que la souche SA198 sécrète des antibiotiques à activité à la fois antibactérienne et antifongique, le milieu ISP2 étant le plus favorable, avec un optimum de production obtenu le 8^{ème} jour au cours de la seconde phase exponentielle de la croissance qui est dans ce cas diauxique.

Les antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198 sont mieux extraits par le dichlorométhane (solvant retenu), par rapport à l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. La révélation microbiologique par bioautographie a mis en évidence une tache notée A, de couleur jaune foncé à l'œil nu, fortement active contre *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus* et modérément active contre *Aspergillus carbonarius*.

L'effet de certains facteurs physicochimiques (pH, température, lumière et conservation au froid) sur le produit A a montré que les activités sont plutôt sensibles aux pH basiques et partiellement résistantes aux températures élevées (100°C et 120°C). Une perte d'activité partielle est notée après une année de conservation. Cependant, une exposition à la lumière n'affecte pas beaucoup l'activité antibiotique.

Le produit A semi-purifié par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice est séparé après purification par HPLC en 12 fractions dont 7 sont actives. Les composés A4 (temps de rétention = TR = 18,7 min), A5 (TR = 21,8 min) et A5.1 (TR = 20,8), de couleur jaune très vif, sont les plus actifs, aussi bien sur les bactéries que sur les champignons.

Ces trois composés ont été caractérisés par des méthodes physico-chimiques et spectroscopiques (UV-visible, infrarouge, spectrométrie de masse, RMN du proton et du carbone 13). Les résultats obtenus ont permis d'identifier la structure chimique des trois composés:

L'antibiotique A4 est le 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-méthyl-hepta-2,4-dienylidene)-3,6-dioxo-cyclohexylidene]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-2-acide carboxylique.

L'antibiotique A5 est le 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-6-méthyl-octa-2,4-dienylidène)-3,6-dioxo-cyclohexylidène]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène-2-acide carboxylique.

L'antibiotique A5.1 est le 4-Hydroxy-4-{9-hydroxy-9-[2-(1-hydroxy-7-méthyl-hepta-2,4-dienylidène)-3,6-dioxo-cyclohexylidène]-nona-1,3,5,7-tetraenyl}-6-oxa-bicyclo[3.1.0]hex-2-ène-2-acide carboxylique.

Les antibiotiques A5 et A5.1 sont des isomères de position et possèdent un CH₂ en plus par rapport à A4. Ce sont des composés qui contiennent deux cycles (dont l'un ayant un groupement époxy) et deux chaînes insaturées non cycliques. Les trois antibiotiques contiennent chacun huit doubles liaisons conjuguées (octaène). Une comparaison de ces trois molécules à celles déjà décrites dans la littérature n'a montré aucune ressemblance, ce qui a permis de les considérer comme étant de nouveaux antibiotiques.

Les trois antibiotiques ont montré une très forte activité contre les champignons filamenteux tels que *Penicillium expansum*, *Mucor ramannianus* et *Aspergillus carbonarius*. Les antibiotiques A5 et A5.1 possèdent la même activité, laquelle est en général plus puissante que celle de A4 contre les champignons filamenteux et plus ou moins équivalente contre les bactéries.

Ce travail vient succéder à l'ensemble des travaux réalisés dans notre laboratoire qui ont porté sur l'isolement des actinomycètes rares producteurs de molécules bioactives. Encore une fois, nous montrons les potentialités des sols sahariens algériens à abriter des espèces originales d'actinomycètes. En effet, *Saccharothrix hoggarensis* SA181 et *S. saharensis* SA152 sont de nouvelles espèces de ce genre, ainsi que très probablement *Saccharothrix* sp. SA198. De plus, leur spectre d'action contre des microorganismes pathogènes est assez intéressant, avec de surcroît, la production de trois nouveaux antibiotiques fortement actifs sécrétés par l'une de ces espèces.

Nos résultats encouragent la poursuite des études sur l'isolement des actinomycètes des milieux extrêmes tels que les sols du Sahara algérien, afin de valoriser deux volets, l'un sur la taxonomie et l'autre sur la production des antibiotiques tout en tenant compte des perspectives qui en découlent et qui sont complémentaires aux différentes parties du travail réalisé.

Concernant la première partie du travail et qui a trait à la taxonomie, il serait intéressant de poursuivre la recherche de nouvelles espèces du genre *Saccharothrix*, en améliorant les méthodes de sélection et en diversifiant les sols et les écosystèmes sahariens. La réalisation de l'hybridation ADN-ADN entre la souche SA198 et les espèces de référence les plus proches phylogénétiquement permettra aussi de confirmer l'originalité de cette souche.

Dans la deuxième partie du travail, il serait intéressant de:

- cibler le screening en utilisant par exemple des germes pathogènes multirésistants aux antibiotiques qui causent des problèmes au niveau sanitaire, ou encore au niveau agronomique.
- optimiser la production d'antibiotiques en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources carbonées et azotées, éléments minéraux, aération, pH, etc.). Ceci permettrait par ailleurs d'étudier les antibiotiques des souches SA152 et SA181 qui se sont montrés aussi intéressants. Vu l'originalité de ces souches, la mise en évidence de nouvelles molécules n'est pas à écarter.
- caractériser les autres antibiotiques du complexe A sécrétés par la souche SA198, à savoir A3, A6, A7 et A8, tout en favorisant leur production.

- compléter les CMI par l'utilisation d'un plus grand nombre de germes-cibles, notamment parmi ceux qui sont multirésistants aux antibiotiques.
- entreprendre des essais de lutte biologique contre les maladies fongiques de certaines plantes en utilisant la souche SA198 et ses antibiotiques, sachant que plusieurs antibiotiques d'origine microbienne sont utilisés à cet effet en agriculture.
- réaliser des tests complémentaires (antitumoraux, antiviraux, inhibition d'enzymes, etc.) pour déterminer le spectre d'action de chacun des antibiotiques, ainsi que des tests de toxicité vis-à-vis des cellules animales, afin de mieux évaluer l'intérêt des antibiotiques de *Saccharothrix* sp. SA198 dans le domaine médical ou vétérinaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amir H. et Amir A. (1989).- Influence de la désinfection et du type de sol sur l'antagonisme d'un actinomycète vis-à-vis d'une souche de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **26**, 57-74.
- Amir H. et Sabaou N. (1983).- Le palmier dattier et la fusariose. XII. Antagonisme dans le sol de deux actinomycètes vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, responsable du bayoud. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, Alger, nouvelle série, **13**, 47-60.
- Andriole V.T. (1998). - Current and future therapy of invasive fungal infections. *In: Current clinical topics in infectious diseases*. Remington G. and Swartz M. (Eds.). Vol. 18. Balckwell Sciences, Malden, pp. 19-36.
- Andriole V.T. (1999). - Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J.Antimicrob. Chemo ther.*, **44**, 151-162.
- Andriole V.T. (2000). - Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **16**, 317-321.
- Aouiche A. (2011). - Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'homme: isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. Mémoire de Magister en microbiologie, Université Djillali Liabès de Sidi-Bel-abbès. 127p.
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F. and Lebrihi A. (2012). - *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World J. Microb. Biot.*, **28**, 943-951.
- Aszalos A. (1986). - Modern analysis of antibiotics. *Drugs and the pharmaceutical sciences*. Vol. 27. Ed, Marcel Dekker, Inc.
- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985). - Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 86-98.
- Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2006). - Antimicrobial compounds produced by *Actinomadurasp.* AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, **52**, 373-382.
- Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E. and Tillequin F. (2007). - Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. *NM94*. *J. Ind. Microbiol.*, **34**, 403-412.
- Baltz R. H. (2007). - Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future, *Microbe*, **2**, 125-131.
- Bhathena Z. P., Vora C. and Kadam K. (2002). - Rapid bioremediation of phenolic effluent through use of actinomycetale consortium. *Pollution Research*, **21**, 265-275.

- Barrett D. (2002). - From natural products to clinically useful antifungals. *Biochemica Biophysica Acta*, **1587**, 224-233.
- Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1965). - Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, **13**, 236-242.
- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E. and Lechevalier H.A. (1964). - Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, **12**, 421-423.
- Belghit S. (2010). - Recherche dans les sols sahariens algériens d'actinomycètes producteurs de molécules actives contre *Candida albicans*. Mémoire de Magister en Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 94 p.
- Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K.L. (1987). - CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. part 1,2,3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- Berdy J. (2005). - Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, **58**, 1-26.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989). - Vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 2648.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994). - 9th Eds. Holt J.H., Kreig N.R, Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Bergogne-Berezi E. et Dellamonica P. (1999). - Antibiothérapie en pratique clinique, 2 Eds. Elsevier-masson, pp. 14.
- Bertasso M., Holzenkammer M., Zeeck A., Stackebrandt E., Beil W. and Fiedler H.P. (2003). - Ripromycin and other polycyclic macrolactams from *Streptomyces* sp. Tu6239. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, **56**, 364-371.
- Betina V. (1973). - Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatogr.*, **78**, 41-51.
- Block S.S. (1983). - Perspectives for industrial products. *In: Disinfection, sterilization and preservation*. Block S.S. (Ed.). 3rd Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, pp. 608-655.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P. and Sabaou N. (2013). - *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **63**, 549-553.
- Boudjelal F., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2011). - Taxonomic study and partial characterization of antimicrobial compounds from a moderately halophilic strain of the genus *Actinoalloteichus*. *Braz. J. Microbiol.*, **42**, 835-845.
- Boudjella H. (1994). - Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 177p.

- Boudjella H., (2007). - Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger. 188p.
- Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and. Lebrihi A. (2010). - Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *J. Antibiot.*, **63**, 709-711.
- Bougnicourt M., (1995). - Dictionnaire de microbiologie générale: la vie racontée par les bactéries, ellipses (Eds), pp. 991.
- Brazhnikova M. G., Konstantinova N.V., Potapova N. P. and Tolstykh I. V. (1977). - Physicochemical characteristics of the new antineoplastic antibiotic, nocamycin. *Antibiotiki.*, **22**, 486-489.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. and Vobi G. (1989). - Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. *In: Biotechnologie des antibiotiques.* Larpent J. P. et Sanglier J. J. (Eds.). Paris, Masson, pp. 33-70.
- Buckingham J. (1997). - Dictionary of Natural Products. Chapman and Hall (Eds.). CRC Press. London.
- Bull A.T. and Stach J.E. (2007). - Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.*, **15**, 491-9.
- Bush B.D., Fitchett G. V., Gates D.A. and Langely D. (1993). - Carbocyclic nucleosides from a species of *Saccharothrix*. *Phytochemistry*, **32**, 737-739.
- Bycroft B.W. (1988). - Dictionary of antibiotics and related substances. Chapman and Hall (Eds.). London, pp. 944.
- Cabib E., Bowers B., Sburlati A. and Silverman S.J. (1988). - Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol. Sci.*, **5**, 370-375.
- Cai Y., Xue Q., Chen Z. and Zhang R. (2009). - Classification and salt-tolerance of actinomycetes in the Qinghai Lake water and Lakeside saline soil. *J. Sustainable Dev.*, **2**, 107-110.
- Chan T. and aszalos A. (1987). - TIC and UV-light spectrometry. *In: Modern analysis of antibiotic.* Aszalos A. (Ed.). Vol. 27. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 1982.
- Collins M.D., Shah H.N. and Minnikin D.E. (1980). - A note on the separation of natural mixtures of bacterial menaquinones using reverse-phase partition thin layer chromatography. *J. Appl. Bacteriol.*, **48**, 277-282.
- Cook A.E. and Meyers P.R. (2003). - Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1907-1915.
- Chorin A.C. (2009). - Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiolopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat, Université I.N.S.A. Toulouse, France. 238 p
- Desjardin V., Bayard R., Huck N., Manceau A. and Gourdon R. (2002). - Effect of microbial activity on the motility of chromium in soils. *Waste Manage.*, **22**, 155-200.
- Das S. and Chandra A.L. (1990). - Chromate reduction in *Streptomyces*. *Experientia*, **46**, 731-733.

- Davies J. (1999). Millennium bugs. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, M2-M5.
- Davies J. and Mazel D. (1997). - Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofutur*, **170**, 14-17.
- De Ley J., Cattoir H. and Reynaerts A. (1970). - The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.*, **12**, 133-142.
- Demain A.L. (1999). - Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Mini-review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 455-463.
- Demain A.L. and Sanchez S. (2009).- Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.*, **62**, 5-16.
- Devereux R., He S.H., Doyle C.L., Orkland S., Stahl D.A., Le Gall J. and Whitman W.B. (1990). -Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: Phylogenetic definition of a family. *J. Bacteriol.*, **172**, 3609-3619.
- Dinya Z.M. and Sztaricskai F.J. (1986). - Ultraviolet and light absorption spectrometry. *In: Modern analysis of antibiotics*. Aszalos A. (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 19-96.
- Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Puglia A. M. (2002). - Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.*, **99**, 187-198.
- Drew S. W. and Demain A.L. (1977). - Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 343-356.
- Driche E. (2010).- Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 121p.
- Drouhet E. and Dupont B. (1987). - Evolution of antifungal agents: past, present and future. *Rev. Infect. Dis.*, **9**, 4-16.
- Embley T.M., Smida J. and Stackebrandt E. (1988). - Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 961-966.
- Essien J. P. and Udosen E. D. (2000). - Distribution of actinomycetes in oil contaminated ultisols of the Niger Delta (Nigeria). *J. Environ. Sci.*, **12**, 296-302.
- Felsenstein J. (1985). - Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol.*, **39**, 783-791.
- Felsenstein J. (1981). - Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, **17**, 368-376.
- Fisher A., Kroppenstedt R.M. and Stackebrandt E. (1983). - Molecular genetic and chemotaxonomic studies on *Actinomadura* and *Nocardioopsis*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 3433-3446.
- Fitch W.M. (1972). -Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.*, **20**, 406-416.
- Fostel J.M. and Lartey P.A. (2000). - Emerging novel antifungal agents. *Therapeutic Focus Reviews*, **5**, 25-32.

- Fudou R., Iizuka T. and Yamanaka S. (2001a). - Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. 1. Fermentation and biological characteristics. *J. Antibiot.*, **54**, 149-152.
- Fudou R., Iizuka T., Sato S., Ando T., Shimba N. and Yamanaka S. (2001b). - Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. 2. Isolation and structural elucidation. *J. Antibiot.*, **54**, 153-156.
- Fujiu M., Sawairi S., Shimada H., Takaya H., Aoki Y., Okuda T. and Yokose K. (1994). - Azoxybacilin, a novel antifungal agent produced by *Bacillus cereus* NR2991. Production, isolation and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **47**, 833-835.
- Gale E.F., Cundcliffe E., Reynolds P.E., Richmond M.H. and Waring M.J. (1981). - Antibiotics affecting the function of the cytoplasmic membrane. Chap. 4. *In: The molecular basis of antibiotic action.* Gale E.F., Cundcliffe E., Reynolds P.E., Richmond M.H. and Waring M.J. (Eds.). 2nd ed. Wiley, London, pp. 175-257.
- Genilloud O., Gonzalez I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R. and Vicente F. - (2011). - Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 375-389.
- Georgopapadakou N.H. and Tkacz J.S. (1995). - The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiol.*, **3**, 98-104.
- Goodfellow M. (1971). - Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **69**, 33-90.
- Goodfellow M. and Alderson G. (1977). - The actinomycetes genus *Rhodococcus*: a home for the "rhodochrous complex". *J. Gen. Microbiol.*, **100**, 99-122.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). - Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 189-216.
- Goodfellow M. and Cross T. (1984). - Classification. *In: The Biology of the actinomycetes.*
- Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (Eds.). Academic Press, London, pp. 7-164.
- Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (1984). - Introduction to and importance of the actinomycetes. *In: The biology of the actinomycetes.* Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (Eds.). Academic Press, London, pp. 1-6.
- Goodfellow M. (1985). - Actinomycete systematics: present and future prospects. Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology. Szabo G., Biro S. and Goodfellow M. (Eds.), pp. 487-496.
- Goodfellow M. (1989). - Suprageneric classification of actinomycetes. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Volume 4. Williams ST, Sharpe ME and Holt JG (Eds.) Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 2333-2339.
- Goodfellow M., Stanton L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E. (1990). - Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 19-36.
- Gordon R.E., Barnett D.A., Handarhan J.E. and Hor-Nay-Pang C. (1974). - *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**, 54-63.

- Groll A. H., Sein T., Petraitis V., Petraitiene R., Callender D., Gonzalez C. E., Giri N., Bacher J., Piscitelli S. and Walsh T.J. (1998). - Compartmental pharmacokinetics and tissue drug distribution of the pradimicin derivative BMS 181184 in Rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2700-2705.
- Goshi K.T., Uchida A., Lezhava M., Yamazaki K., Hiratsu H., Shinkawa H. and Kinashi H. (2006). - Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, **184**, 3411-3415.
- Cross T. (1981). - Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 397-423.
- Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1989). - Transfer of five *Nocardioopsis* species to the genus *Saccharothrix* Labeda et al. 1984. *Syst. Appl. Microbiol.*, **12**, 267-274.
- Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1990). - Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardioopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.
- Gupte M., Kulkarni P. and Ganguli B. N. (2002). - Antifungal antibiotics. Mini-Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 46-57.
- Gürtler V. and Mayall B.C. (2001). - Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 3-16.
- Hacène H., Sabaou N., Bounaga N. and Lefebvre G. (1994). - Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare *Actinomycetales*. *Microbios*, **79**, 81-85.
- Hamaki T., Suzuki M., Fudou R., Jojima Y., Kajjura T., Tabuchi A., Sen K. and Shibai H. (2005). - Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 485-492.
- Harvey I., Cormier Y., Beaulieu C., Akimov V.N., Meriaux A. and Duchaine C. (2001). - Random amplified ribosomal DNA restriction analysis for rapid identification of thermophilic actinomycete-like bacteria involved in hypersensitivity pneumonitis. *Syst. Appl. Microbiol.*, **24**, 277-284.
- Hashizume H., Adachi H., Igarashi M., Nishimura Y. and Akamatsu Y. (2010). - Biological activities of pargamicin A, a novel cyclic peptide antibiotic from *Amycolatopsis* sp., *J. Antibiot.*, **63**, 279-283.
- Haste N.M., Perera V.R., Maloney K.N., Tran D.N., Jensen P., Fenical W. and Nizet V. (2010). - Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antibiot.*, **63**, 219-224.
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1984). - HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. Annual Meeting of the Actinomycetologists, Osaka, Japan. p 6.
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1987). - Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.*, **65**, 501-509.
- Hayakawa M., Sadakata T., Kajjura T. and Nonomura H. (1991). - New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *J. Ferm. Bioeng.*, **72**, 320-326.
- Hayakawa M., Iino H., Takeuchi S. and Yamazaki T. (1997). - Application of a method incorporating treatment with chloramine-T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 599-602.

- Hayakawa M., Otaguro M., Takeuchi T., Yamazaki T. and Imura Y. (2000). - Application of a differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant method incorporating litter. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 171-185.
- Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K.-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P.S., Teniola D. and Addo P. (2002). - Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone. *PCT. Int. Appl.*, 19.
- Horvath G., Brazhnikova M.G., Konstantinova N.V., Tolstykh I.V. and Potapova N.P. (1979). - The structure of nocamycin, a new antitumor antibiotic. *J. Antibiot.*, **32**, 555-558.
- Hu Y.T., Zhou P.J., Zhou Y-G., Liu Z-H. and Liu S-J. (2004). - *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi lake, Xinjiang, China. *Int. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2091-2094.
- Hurley L.H. and Bialek D. (1974). - Regulation of antibiotic production: catabolite inhibition and the dualistic effect of glucose on indolmycin production. *J. Antibiot.*, **27**, 49-56.
- Huss V. A. R., Festl H., Schleifer K. H. (1983). - Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.*, **4**, 184-192.
- Igarashi M., Kinoshita N., Ikeda T., Kameda M., Hamada M. and Takeuchi T. (1997). - Resormycin, a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **50**, 1020-1025.
- Isshiki K., Sawa T., Naganawa H., Matsuda N., Hattori S., Hamada M. and Takeuchi T. (1989). - 3-O-isobutyrylkinamycin C and 4-deacetyl-4-O-isobutyrylkinamycin C, new antibiotics produced by a *Saccharothrix* species. *J. Antibiot.*, **42**, 467-469.
- Jain T.C., Newman D.J. and Shearer M.C. (1982). - Polynitroxin antibiotics produced by *Nocardiosis mutabilis* Shearer sp. nov. ATCC 31520. *U.S.* **4**, 317-812.
- Joffin J.N. and Leyral G. (2006). - Microbiologie technique - Tome 1: Dictionnaire des techniques. CRDP d'Aquitaine, pp. 368.
- Johnson J.A., Citarasu T. and P. A. Mary Helen P.A. (2012). - Screening of antibiotic producing actinomycetes from streams. *J. Chem. Bio. Phy. Sci.*, **2**, 1363-1370.
- Johnson J.L. (1989). - Bacterial classification. III. Nucleic acids in bacterial classification. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4, Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 2306-2309.
- Jukes T.H. and Cantor C.R. (1969). - Evolution of protein molecules. *In: Mammalian protein metabolism*. Munro H.N. (Ed.). Vol. 3. Academic Press, New York, pp. 21-132.
- Junker B., Walker A., Hesse M., Lester M., Christensen J. and Connors N. (2009). - Actinomycetes scale up for the production of antibacterial nocathiacin. *Biotechnol. Prog.*, **25**, 176-188.
- Kalinovskaya N.I., Kalinovskiy A.I., Romanenko L.A., Dmitrenok P.S., and Kuznetsova T.A. (2010). - New angucyclines and antimicrobial diketopiperazines from the marine mollusk-derived actinomycete *Saccharothrix espanaensis* An 113. *Nat. Prod. Commun.*, **5**, 597-602.

- Kennel Y.M. and Demain A.L. (1978).- Effect of carbon on #-lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acremonium*. *Exp. Mycol.*, **2**, 234-238.
- Kerridge D. (1986). - Mode of action of clinically important antifungal drugs. *In: Advances in microbial physiology*. Vol. 27. Rose A.H. and Tempest D.W. (Eds.). Academic Press, London, pp. 1-72.
- Khamna S., Yokota A. and Lumyong S.(2009). - Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *WorldJ. Microbiol. Biotechnol.*, **25**,649-655.
- Khebizi. N. (2010).- Taxonomie et activités antimicrobiennes de souches d'actinomycètes d'origine saharienne. Mémoire de Magister en Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 127 p.
- Kirby J.P., Maise W.M., Testa R.T. and Labeda D.P. (1987). - New antibacterial LL - C 19004 cpd-prepd. by fermentation of *Saccharothrix espanaensis*. *U.S.*, **4**, 699-790.
- Kimura M. (1980). - A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**, 111-120.
- Kim Y. J., Furihata K., Shimazu A., Furihata K. and Seto H. (1991). - Isolation and structural elucidation of sekothrixide, a new macrolide effective to overcome drug-resistance of cancer cells. *J. Antibiot.*, **44**, 1280-1282.
- KimB. Y., BrownR., LabedaD.P. and Goodfellow.M. (2011). - Reclassification of *Dactylosporangium variesporum* as *Saccharothrix variisporea* corrig. (ex Tomita et al. 1977) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*,**61**, 310-314.
- Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S. and Chun J. (2012). - Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol.*,**62**, 716-21.
- Kinoshita N., Igarashi M., Ikeno S., Hori M. and Hamada M. (1999). - *Saccharothrix tangerinus* sp. nov., the producer of the new antibiotic formamicin: taxonomic studies. *Actinomycetologica*, **13**, 20-31.
- Kominek L.A. (1972). - Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*.*Antimicrob. Agents Chemother.*, **1**, 123-124.
- Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E. and Goodfellow M. (1990). - Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **13**, 148-160.
- Kurtz M.B. and Douglas C.M. (1997). - Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J. Med. Vet. Mycol.*, **35**, 79-86.
- Labeda D.P., Testa R.T., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1984). - *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 426-431.
- Labeda D.P. (1988). - An evaluation of strains of the genus *Saccharothrix* by numerical taxonomic and molecular taxonomic methods. *In: Biology of actinomycetes 88*. Okami Y., Beppu T. and Ogawara H. (Eds). Japan Society Scientific Press, Tokyo. pp. 227-232.

- Labeda, D.P. (1987). - Actinomycete taxonomy; generic characterization. *Dev. Ind. Microbiol.*, **28**, 115-121 .
- Labeda D.P. and Lechevalier M.P. (1989). - Amendment of the genus *Saccharothrix* Labeda *et al.* 1984 and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 420-423.
- Labeda, D.P. and Lyons, A.J. (1989). - *Saccharothrix texasensis* sp. nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 355 - 358.
- Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000). - Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 331-336.
- Labeda D.P., Hatano, K., Kroppenstedt, R.M. and Tamura, T. (2001). - Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Leechevalieria* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1045-1050.
- Labeda, D. P. and Kroppenstedt, R. M. (2006). - *Goodfellowia* gen. nov., a new genus of the *Pseudonocardineae* related to *Actinoalloteichus*, containing *Goodfellowia coeruleoviolacea* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 1203-1207.
- Labeda, D. P. and Kroppenstedt, R. M. (2007). - Proposal of *Umezawaea* gen. nov., a new genus of the *Actinosynnemataceae* related to *Saccharothrix*, and transfer of *Saccharothrix tangerinus* Kinoshita *et al.* 2000 as *Umezawaea tangerina* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2758-2761.
- Lam K.S., Schroeder D.R., Veitch J.M., Colson K.L., Matson J.A., Rose W.C., Doyle T.W. and Forenza S. (2000). - Production, isolation and structure determination of novel fluorindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *J. Antibiot.*, **54**, 1-9.
- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F. (2002a). - New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, **55**, 696-701.
- Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E. and Tillequin F. (2002b). - New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **55**, 702-707.
- Larparent J.P. et Sanglier J.J. (1989). - Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris, pp. 481.
- Larparent-Gourgaud M. et Sanglier J.J. (1992). - Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris.
- Laskin A.I. and Lechevalier H. (1984). - Handbook of Microbiology. Vol. 3, CRC Press.
- Laurent F.J., Provost F. and Boiron P. (1999). - Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 99-102.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. (2001) - Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 399-405.

- Lebrihi A., Germain P. and Lefebvre G. (1987). - Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 130-135.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970a). - Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In: « The Actinomycetales »* Prauser H. (Eds.) Fisher Verlag, Jena, pp. 311-316.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970b). - Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**, 435-443.
- Lechevalier M.P., De Bievre C., Lechevalier H.A. (1977). - Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, **5**, 249-260.
- Lechevalier M.P. (1981). - Ecological associations involving actinomycetes. *In: Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. Suppl.*, **11**, 159-166.
- Lechevalier M.P., Prauser H., Labeda D.P. and Ruan J.S. (1986). - Two new genera of nocardioformactinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 29-37.
- Li Y. V., Terekhova L. P. and Gapochka M. G. (2002). - Isolation of actinomycetes from soil using extremely high frequency radiation. *Microbiology*, **71**, 105-108.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pedersen, J. (2000). - Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 471.
- Lombardi P. and Crisanti A. (1997). - Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. *Pharmacol. Ther.*, **76**, 125-133.
- Long P.F., Wildman H.G. and Amphlett G.E. (1994). - The use of statistical models to predict the effects of pretreatments on the total viable counts of actinomycetes isolated from soil. *Actinomycetes*, **5**, 1-8.
- Makkar N.S. and Cross T. (1982). - Actinoplanetes in soil and on plant litter from freshwater habitats. *J. Appl. Bacteriol.*, **52**, 209-218.
- Mallié M. et Bastide J.M. (2001). - Les nouveaux antifongiques et leurs stratégies de recherche. *Revue Française des Laboratoires*, **332**, 63-70.
- Marchal N., Bourdon J.L. and Richard Cl. (1987). - Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin editor. Paris, pp. 67-122.
- Martin J.F. (1979). - Polyene macrolide antibiotics. *In: Economic Microbiology*. Rose A.F. (Ed.). Academic Press, London, pp. 355-387.
- Matsuo N., Negishi A. and Negishi Y. (2003). - Jpn. Kokai Tokkyo Koho, pp. 6.
- Mechlinski W. (1978). - The polyene antifungal antibiotics. *In: Handbook of microbiology*. Vol. 3. Laskin A.I. and Lechevalier H.A. (Eds). CRC Press. pp. 93-107.
- Meklat A. (2012). - Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycetes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat en Biologie spécialité microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger, 160 p.
- Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F. and Lebrihi A. (2011). - Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Appl. environ. Microbiol.*, **77**, 6710-4.

- Meklat A. (2004). - Effet des antibiotiques de deux souches d'actinomycètes sur la maladie tache chocolat et l'antracnose de la fève et sur la fusariose vasculaire du lin. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 97 p.
- Merck E. (1975). - Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt. pp.149.
- Merrouche R. (2000). - Influence d'une souche de *Saccharothrix (Actinomycetales)* et de son antibiotique, la thiolutine, sur l'expression de la fusariose vasculaire de quelques plantes cultivées. Thèse de Magister en Ecophysiologie végétale, E.N.S. de kouba, Alger.101 p.
- Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A. (2010). - Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J. Nat. Prod.*, **73**, 1164-1166.
- Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2011). - New dithiopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol. Lett.*, **318**, 41-46.
- Metzger R., Bonatti H. and Sawyer R. (2009). - Future trends in the treatment of serious gram-positive infections, *Drugs Today (Barc)*, **45**, 33-45.
- Meyer J. (1989). - Genus *Nocardiosis* Meyer 1976. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4. Williams S. T., sharpe M. E. and Holt J. G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 2562-2568.
- Minnikin D.E., Patel P.V., Alshamaony L. and Goodfellow M. (1977). - Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**,104-107.
- Minnikin D.E., Hutchinson I.G. and Caldicott A.B. (1980). - Thin layer chromatography of methanolysates of mycolic acid containing bacteria. *J. Chromatogr.*, **188**, 224-233.
- Minnikin D.E., O'Donnell A.G., Goodfellow M., Alderson G., Athalye M., Schaal A. and Parlett J.H. (1984). - An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J. Microbiol. Meth.*, **2**, 233-241.
- Misato T. (1982). - Present status and future prospects of agricultural antibiotics. *J. Pesticides Sci.*, **7**, 301-305.
- Miyadoh S., Amano S., Tohyama H. and Shomura T. (1990). - A taxonomic review of the genus *Microbispora* and a proposal to transfer two species to the genus *Actinomadura* and to combine ten species into *Microbispora rosea*. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 1905-1913.
- Mordarska H., Mordarski M. and Goodfellow M. (1972). - Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **71**, 77-86.
- Moulin. M. et Coquerel, A. (1998). - Pharmacologie, connaissances et pratique. 2ème édition, Masson, pp. 10-30.
- Moustiri A. (1992). - Etude comparative des actinomycètes de la rhizosphère de deux cultivars de palmier dattier sensible et résistant au bayoud. Influence de quelques isolats sur l'expression de la fusariose. Thèse de Magister en Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger.

- Murakami R., Tomikawa T., Shin-ya K., Shinozaki J., Kajiura T., Kinoshita T., Miyajima A., Seto H. and Hayakawa Y. (2001). - Ammocidin, a new apoptosis inducer in Ras-dependent cells from *Saccharothrix* sp. I. Production, isolation and biological activity. *J. Antibiot.*, **54**, 710-713.
- Murakami R., Shinozaki J., Kajiura T., Kozone I., Takagi M., Shin-Ya K., Seto H. and Hayakawa Y. (2009). Ammocidins B, C and D, new cytotoxic 20-membered macrolides from *Saccharothrix* sp. AJ9571. *J. Antibiot.*, **62**, 123-127.
- Muzammil S. (2012). - [Saccharothrix algeriensis](#) [NRRL B-24137: an endophytic actinomycetal strain enabling to determine new bioactive metabolites for biocontrol, to control Botrytis cinerea on grapevine as well as to understand mechanisms of ISR in plants.](#) Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 197 p.
- Nakamura K., Kimura T., Takahashi E. (1999). - Synthesis and biological activities of phosphonothrixin. Phosphorus, sulfur and silicon and the related elements. *Naturstoffen. Angew. Chem.*, **69**, 50-58.
- Nolan R.D. and Cross T., (1988). - Isolation and screening of actinomycetes in biotechnology. *In* : Biology of industrial microorganisms. Demain A. L. and Solomon N. A. (Eds). Academic Press, London, pp.1-32.
- Ochi K., Haraguchi K. and Miyadoh S. (1993). - A taxonomic review of the genus *Microbispora* by analysis of ribosomal protein AT-L30. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 58-62.
- Okami Y. and Hotta K., 1988. - Search and discovery of new antibiotics. *In*: M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski (eds.) Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, New York, pp. 33-67.
- Oki T., Tenmyo O., Tomatsu K. and Kamei H. (1990). - Pradimicins A, B and C: new antifungal antibiotics II. *In vitro* and *in vivo* biological activities. *J. Antibiot.*, **30**, 334-336.
- Orchard V. A. and Goodfellow M. (1980). - Numerical classification of some named strains of *Nocardia asteroides* and related isolates from soil. *J. Gen. Microbiol.*, **118**, 295-312.
- Orchard V.A., Goodfellow M. and Williams S.T. (1977). - Selective isolation and occurrence of nocardiae in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **9**, 233-238.
- Otoguro M., Tamura T., Suzuki K.I. and Hayakawa M. (2009). - *Saccharothrix violaceirubra* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 1504-1507.
- Palleroni N.J. (1980). - A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanaceae*. *Arch. Microb.*, **128**, 53-55.
- Peczynska-Czoch W. and Mordarski H. (1988). - Actinomycetes enzymes. *In*: Actinomycetes in Biotechnology. Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. (Eds.). Academic Press, London, pp. 219-283.
- Pfefferle C., Breinholt J., Gurtler H. and Fiedler H.P. (1997). - 1-Hydroxy-4-methoxy-2-naphthoic acid, a herbicidal compound produced by *Streptosporangium cinnabarinum* ATCC 31213. *J. Antibiot.*, **50**, 1067-1068.

- Perry D.A., Tone J., Maeda H., (1990). - Antiparasitic menaquinones from *Saccharothrix*. (Pfizer Ltd., UK). Brit. UK Pat. Appl, pp. 28.
- Poschner J., Kroppenstedt R.M., Fischer A. and Stackebrandt E. (1985). - DNA-DNA reassociation and chemotaxonomic studies on *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Micropolyspora* and *Nocardiopsis*. *System. Appl. Microbiol.*, **6**, 264-270.
- Powell N.A. and Roush W. (2001). - Studies on total synthesis of formamicin: synthesis of the C(1)-C(11) fragment. *Org. Lett.*, **3**, 454-456.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M., Dusart J. (2002). - Microbiologie. De Boeck Université, pp.1147.
- Pridham T. G. and Tresner H. G. (1974).- Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn, pp. 748-829. Edited by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Rachedi. F.Z., (2010). - Etude des actinomycètes sahariens antagonistes de quelques souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales. Mémoire de Magister en Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger.
- Rademaker J.L.W., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Swings J., Vauterin L., Vauterin P. and Bruijn F.J. (2000). - Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 665-677.
- Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R.M. and Stackebrandt E. (1996). - The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 1088-1092.
- Räty K., Kantola A., Hakala J., Ylihönko K. and Mantsala P. (2002). - Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* a clacinomycin polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene*, **293**, 115-122.
- Roh H., Uguru G.C., Ko H.J., Kim S., Kim B.Y. and Goodfellow M. (2011). - Genome sequence of the abyssomicin and proximycin-producing marine actinomycete *Verrucosipora maris* AB-18-032, *J. Bacteriol.*, **193**, 3391-3392.
- Rouessac F. (1992). - Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. Masson. Paris, pp. 294.
- Roy K., Mukhopadhyay T., Reddy G.C.S., Desikan K.R., Ganguli B.N. (1987). - Mulundocandin, a new lipopeptide antibiotic. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.*, **40**, 275-280.
- Sabaou N., Amir H. et Bounaga N. (1980). - Le palmier dattier et la fusariose. X. - Dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère: leur antagonisme vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Ann. Phytopathol.*, **12**, 253-257.
- Sabaou N. (1988). - Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger. 192 p.
- Sabaou N. et Bounaga N. (1987). - Actinomycètes parasites de champignons: étude des espèces, spécificité de l'action parasitaire au genre *Fusarium* et antagoniste dans

- le sol envers *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian et Marie) Gordon. *Can. J. Microbiol.*, **33**, 445-451.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. and Germain P. (1998). - les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, **9**, 147-153.
- Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. et Bounaga N. (1992). - Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 1066-1073.
- Saitou N. and Nei M. (1987). - The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- Sanglier J.J., Haang H., Huck T.A. and Fehr T. (1993). - Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, **144**, 633-642.
- Sanglier J.J., Haag H., Huck T.A. and Fehr T. (1996). - Review of actinomycetes compounds 1990-1995. *Expert Opin. Invest. Drugs*, 1996, **5**, 207-23.
- Sasser M. (1990). - Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101. MIDI Inc., Newark.
- Sato T., Hirayama F. and Saito T. (1991). - A new alkaloid antibiotic tetrazomine. Structure determination. *J. Antibiot.*, **44**, 1367-1370.
- Sawada Y., Mumata K.I., Murakami T., Tanimichi H., Yamamoto S. and Oki T. (1990). - Calcium dependent anticandidal action of pradimicin A. *J. Antibiot.*, **43**, 715-721.
- Schmatz D.M., Abruzzo G., Powles M.A., McFadden D.C., Balkovec J.M., Black R.M., Nollstadt K. and Bartizal K. (1992). - Pneumocandins from *Zalerion arboricola*. IV. Biological evaluation of natural and semi synthetic pneumocandins for activity against *Pneumocystis carinii* and *Candida* species. *J. Antibiot.*, **45**, 1886-1891.
- Schumacher R.W., Harrigan B.L. and Davidson B.S. (2001). - Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 5133-5135.
- Schwartz R.R., Giacobbe R.A., Bland J.A. and Monaghan R.L. (1989). - L-671,329, a new antifungal agent. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot.*, **42**, 163-167.
- Scriban R. (1999). - Biotechnologie. 5ème édition. Tec et Doc.(Ed), Paris, pp. 1042.
- Seto H., Shimazu A. (1992). - Novel anticancer cyclic compound CF-24 and its manufacture with *Saccharothrix* species. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, pp. 7.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966). - Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**, 3313-3340.
- Sierra G. (1957). - A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *J. Microbiol. Serol.*, **23**, 15-22.
- Singh M.P., Petersen P.J., Weiss W.J., Kong F. and Greenstein M. (2000). - Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2154-2159.

- Skurnik A.H., Ammari R., Ruimy D., Andremont D. Mazel A.M., Guerout F. Assaous K. and Rahal.(2007).- Antibiotic resistance conferred by a class I integron and sxt element in different *Vibrio cholerae* o-serotype isolated in Algeria. *Eccmid*, Munich, 2007.
- Solanki R., Khanna M. and Lal R. (2008). - Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Ind. J. Microbiol.*, **48**, 410-431.
- Solans M., Vobis G., Cassàn F. and Wall L. G. (2009). -Saprophytic actinomycetes promote nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high N.J . *Plant Growth Regul.*, **28**, 106-114.
- Solans M., Vobis G., Cassàn F., Luna V. and Wall L. G. (2011). - Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant *Ochetophila trinervis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 2195-2202.
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012). - Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol.*, **7**, 373-390.
- Sp#žek J. and Tich# P. (1995). - Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol.*, **40**, 43-50.
- Stackebrandt E. and Woese C.R.(1981). - The evolution of prokaryotes. Symposia of the Society for General Microbiology, **32**, 1-31.
- Stackebrandt E., Wunner-Fiissl B., Fowler V.J. and Schleifer K.H. (1981a). - Deoxyribonucleic acid homologies and ribosomal ribonucleic acid similarities among sporeforming members of the order *Actinomycetales*. *Int. J. System. Bacteriol.*, **31**, 420-431.
- Stackebrandt E., Ludwig W., Scleifer K.H. and Cross H.J. (1981b). - Rapid cataloging of ribonuclease T1 resistant oligonucleotides from ribosomal RNAs for phylogenetic studies. *J. Mol. Evol.*, **17**, 227-236.
- Stackebrandt E., Ludwig W., Seewaldt E. and Schleifer K.H. (1983). - Phylogeny of sporeforming members of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 173-180.
- Stackebrandt E. (1986). - The significance of 'wall-types' in phylogenetically based taxonomic studies on actinomycetes. *In: Szab G., Bit S. and Goodfellow M. (Eds.) Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Akaddmiai Kiad, Budapest*, pp 497-506.
- Stackebrandt E. and Kroppenstedt R.M. (1987). - Union of the genera *Actinoplanes* Couch, *Ampullariella* Couch and *Amorphosporangium* Couch in a redefined genus *Actinoplanes*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 110-114.
- Stackebrandt E. and GoebelB. M. (1994). - A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,**44**,846-849.
- Stackebrandt E., Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997). - Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,**47**,479-491.

- Stapley E.O. (1982). - Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolated from a soil in Japan. *In: Trends in antibiotic research.* Umezawa H., Demain A.L., Hata R. and Hutchinson C.R. (Eds.). Japan Antibiotic Research Association, Tokyo, pp. 154-170.
- Steingrube V.A., Wilson R.W., Brown B.A., Jost K.C., Blacklock Z., Gibson J.L. and Wallace R.J. (1997). - Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *streptomyces* and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J. clin. Microbiol.*, **35**, 817-822.
- Strub C. (2008). - Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrixalgeriensis*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 203p.
- Sugawara T., Tanba T., Kaneda Y., Yamamoto H. and Adachi T. (1999). - Antifungal thiazolylpyridine compound from *Saccharothrix* species and pharmaceutical compositions containing it. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, pp.10.
- Suzuki K., Sato T., Moriok M., Nagal K., Abe K., Yamaguchi H. And Saito T. (1991). -Tetrazomine, a new antibiotic produced by actinomycete strain: taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot*, **44**, 479-485.
- Suzuki S.I., Okuda T. and Komatsubara S. (1999). - Selective isolation and distribution of Sporichthya strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1930-1935.
- Schwarz S., Kehrenberg C. and Walsh T.R. (2001). - Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **17**, 431-437.
- Takahashi A., Hotta K., Saito N., Morioka M., OkamiY. and Umezawa H. (1986). - Production of novel antibiotic, dopsisamine by new subspecies of *Nocardioopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot.*, **39**, 175-183.
- Takahashi E., Kimura T., Nakamura K., Arahira M. and Iida M. (1995). - Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **48**, 1124-1129.
- Takeuchi T., Hara T., Naganawa H., Okada M., Hamada M., Umezawa H., Gomi S., Sezaki M. and Kondo S. (1988). - New antibiotics, benanomicins A and B from an actinomycete. *J. Antibiot.*, **41**, 807-811.
- Takeuchi M., Takahashi S., Enokita R., Sakaida Y., Haruyama H., Nakamura T., Katayama T. and Inukai M. (1992). - Galacardines A and B, new glycopeptide antibiotics. *J. Antibiot.*, **45**, 297-305.
- Tiwari K. and Gupta R.K. (2011). - Rare actinomycetes: a potential storehouse for novelAntibiotics. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **32** , 108-132.
- Tkacz J.S. (1992). - Glucan biosynthesis in fungi and its inhibition. *In: Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy.* Sutcliffe J. and Georgopapadakou N.H. (Eds.). Chapman and Hall. New York, pp. 495-523.
- Tokiwa Y. and Calabia B.P. (2006). - Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , **72** , 244-251

- Toumatia O. (2010). - Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 115p.
- Tsuboya S., Takayuki D., Takenori I. and Kenji H. (1996). - Substance P antagonists manufacture with microorganism. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, pp.16.
- Ueki T., Numata K.I., Sawada Y., Nishio M., Ohkuma H., Toda S., Kamachi H., Fukagawa Y. and Oki T. (1993). - Studies on the mode of antifungal action of pradimicin antibiotics. II. D-mannopyranoside binding site and calcium binding site. *J. Antibiot.*, **46**, 455-469.
- Vandamme E.J. (1985). - Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences. Vol. 22. Marcel Dekker. New York, pp. 808.
- Vaneechoutte M. (1996). - DNA fingerprinting techniques for microorganisms. *Mol. Biotechnol.*, **6**, 115-143.
- Vertesy L., Barbone F.P., Cashmen E., Decker H., Ehrlich K., Jordan B., Knauf M., Schummer D., Segeth M. P., Wink J. and Seibert G. (2001). - Pluraflavins, potent antitumor antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiot.*, **54**, 718-29.
- Vessey J.K. (2003). - Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant soil*, **255**, 571-586.
- Waksman S.A. and Henrici A.T. (1943). - The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **46**, 337-341.
- Waksman S.A. (1961). - The actinomycetes. Classification, identification and descriptions of genera and species. Vol. 2. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 1-363.
- Wang, Z.X., Li, S.M. and Heide, L. (2000). - Identification of the coumermycin A, biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* and biochemical SSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3040-3048.
- Wang, L., Zhang Y., Lu Z., Shi Y., Liu Z., Maldonado L., and Goodfellow M. (2001). - *Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1783-1788.
- Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. and Bhole B.D. (2001). - How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.*, **176**, 386-390.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murry R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. and Trüper H.G. (1987). - Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 463-464.
- Williams S.T. (1978). - Streptomycetes in the soil ecosystem. In: *Nocardia and Streptomyces*. Mordarski M., Kurylowicz W. and Jeljaszewicz (Eds.), Fischer Verlag G., Stuttgart, pp.137-144.
- Williams S.T. and Wellington E.M.H. (1981). - The genus *Streptomyces*- A taxonomic enigma. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Suppl.*, **11**, 47-57.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A. and Sackin M.J. (1983). - Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1743-1813.

- Williams D.H. and Fleming I. (1989). - Spectroscopic methods in organic chemistry. 4th Eds. Mc Graw Hill book company, London, pp. 264.
- Williams S.T., Goodfellow M. and Alderson G. (1989). - Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.), Volume 4. Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 2452-2492.
- Yamaguchi T. (1965). - Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **89**, 444-453.
- Yan X., Huang L.L., Tu X., Gao X.N. and Kang Z.S. (2011). - *Saccharothrix yanglingensis* sp. nov., an antagonistic endophytic actinomycete isolated from cucumber plant. *Antonie van Leeuwenhoek*, 9631-9639.
- Yang Y. L. and Lo H.J. (2001). - Mechanisms of antifungal agent resistance. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **34**, 79-86.
- Yassin A.F., Rainey F.A., Brzezinka H., Jahnke K.D., Weissbrodt H., Budzikiewicz H., Stackebrandt E. and Schaal K.P. (1995). - *Lentzea* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 357-363.
- Yuting H., Fenghua R., Peijin Z., Xia Min X. and Shuangjiang L. (2003). - Degradation of pyrene and characterization of *Saccharothrix* sp. PYX-6 from the oligotrophic Tianchi Lake in Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. *Chin. Sci. Bull.*, **48**, 2210-2215.
- Zaria L.T. (1993). - *Dermatophilus congolensis* infection (dermatophilosis) in animals and man. An update. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **16**, 179-222.
- Zakharova O.S., Zenova G.M. and Zvyagintsev D.G. (2003). - Some approaches to the selective isolation of actinomycetes of the genus *Actinomadura* from soil. *Microbiol.*, **72**, 110-113.
- Zhou J., Sun C., Wang N., Gao R., Bai S., Zhenq H., You X. and Li R. - (2006). Preliminary report on the biological effects of space flight on the producing strain of a new immunosuppressant kanglemycin C. *J. Ind. Microbiol.*, **33**, 707-712.
- Zitouni, A. (1995). - Les genres *Nocardopsis* et *Saccharothrix* (*Actinomycetales*) dans les sols sahariens: taxonomie numérique; extraction purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 177 p.
- Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. and Labeda D.P. (2004a). - *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1377-1381.
- Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004b). - Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, **57**, 367-372.
- Zitouni A., Mathieu F., Coppel Y., Pont F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004c). - Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **57**, 373-378.

Zitouni A. (2005). - Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardioopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 230 p.

Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005). - *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.*, **156**, 984-993.

WEB graphie (se référer à la page 6).

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Micrococcus_luteus_9758.jpeg

<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Arthrobacter>

http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/actinomycetes/n/Nocardia_transvalensis_SEM.htm

<http://www.cmde.science.ubc.ca/mohn/resrhodo.html>

<http://www0.nih.go.jp/saj/Atlas/atlas.cgi?section=7>

<http://ijs.sgmjournals.org/content/54/6/2061.full>

<http://ijs.sgmjournals.org/content/58/7/1653.full.pdf>

<http://www.readcube.com/articles/10.1038/ja.2012.57>

ANNEXES

ANNEXE I MILIEUX DE CULTURE

I.- MILIEUX D'ISOLEMENT DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES

1.- Milieu acides humiques - vitamines B agar (Hayakawa et Nonomura, 1987)

Acides humiques (Fluka): 1 g; Na₂HPO₄: 0,5 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,05 g; KCl: 1,7 g; FeSO₄, 7H₂O: 0,01 g; CaCO₃: 0,02 g; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

2.- Milieu chitine - vitamines B agar (Hayakawa et Nonomura, 1987)

Chitine: 2 g; K₂HPO₄: 0,35 g; KH₂PO₄: 0,15 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g; NaCl: 0,3 g; CaCO₃: 0,02 g; FeSO₄, 7H₂O: 10 mg; ZnSO₄, 7H₂O: 1 mg; MnCl₂, 4H₂O: 1 mg; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

* Les vitamines: thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine-HCl, inositol, panthoténate de calcium: à raison de 0,5 mg l⁻¹ et biotine: 0,25 mg l⁻¹. Les vitamines sont stérilisées à l'éther puis dissoutes en solution aqueuse stérile avant d'être ajoutées aseptiquement au milieu autoclavé.

II.- MILIEUX D'IDENTIFICATION DES ISOLATS D'ACTINOMYCETES

1.- Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966). L'ISP3 et l'ISP4 sont prêts à l'emploi (DIFCO).

1.1.- Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml; agar: 20 g. pH 7,2.

1.2.- Milieu ISP3

Farine d'avoine: 20 g; solution saline standard: 1 ml; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

* solution saline standard: FeSO₄, 7H₂O: 0,1 g; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g; ZnSO₄, 7H₂O: 0,1 g; eau distillée q.s.p. 100 ml.

1.3.- Milieu ISP4

Amidon: 10 g; K₂HPO₄: 1 g; MgSO₄, 7H₂O: 1 g; NaCl: 1 g; (NH₄)₂SO₄: 2 g; CaCO₃: 2 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 ml; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

1.4.- Milieu Bennett (Waksman, 1961)

Glucose: 10 g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

1.5.- Milieu Tryptic Soya Agar (TSA) (Waksman 1961)

Bacto tryptone (digestion pancréatique de caséine): 15 g; bacto soytone (digestion papaïque de semoule de soja): 5 g; chlorure de sodium: 5 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,3 ± 0,2.

2.- Etude physiologique

2.1.- Dégradation des glucides et dérivés (Gordon et al., 1974)

Les glucides, stérilisés à l'éther, sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1%.

Milieu de base:

(NH₄)₂ HPO₄: 1 g; KCl: 0,02 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g; rouge de phénol: 0,012 g; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7.

Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif). Le milieu contenant du glucose sert de témoin positif.

2.2.- Milieu de base des acides aminés (comme seules sources de carbone et d'azote)

C'est le même milieu que celui utilisé pour les sucres, mais en soustrayant le (NH₄)₂ HPO₄.

2.3.- Dégradation du Tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80: 10 ml ; NaNO₃: 1 g; extrait de levure: 5 g; solution saline: 50 ml; CaCl₂, 2H₂O: 0,1 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml; agar: 18 g. pH 7,2.

* solution saline: K₂HPO₄: 0,25 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,125 g; NaCl: 0,125 g; FeSO₄, 7H₂O: 0,001 g; MnSO₄: 0,001 g; eau distillée q.s.p. 50 ml.

La dégradation du Tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

2.4.- Dégradation de l'adénine, de la guanine, de la tyrosine, de l'hypoxanthine, de la xanthine et de la testostérone (Goodfellow, 1971; Gordon et al., 1974)

0,4 g de chaque composé (sauf pour la guanine et la testostérone: 0,2 g) est suspendu dans 10 ml d'eau distillée et stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile et maintenue en surfusion à 50°C.

* gélose nutritive: peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; NaCl: 5 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,5.

La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

2.5.- Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1987)

Une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

2.6.- Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)

4 g de gélatine dans 100 ml de gélose nutritive.

Le réactif de Frazier permet de mettre en évidence la dégradation de gélatine (auréole claire autour des colonies).

2.7.- Dégradation de la caséine du lait (Gordon et al., 1974)

10 g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100 ml d'eau distillée (pH 7,5), puis stérilisés à l'autoclave. 100 ml d'eau distillée (pH 7,5) contenant 3,6 g d'agar sont parallèlement autoclavés.

Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Pétri stériles.

2.8.- Dégradation de l'esculine et de l'arbutine (Marchal et Bourdon, 1987)

Esculine (ou arbutine): 1 g; citrate de fer ammoniacal: 1 g; peptone: 10 g; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7.

La dégradation de ces 2 hétérosides se manifeste par l'apparition d'un pigment brun à noir autour des colonies.

2.9.- Dégradation des sels de sodium (Gordon *et al.*, 1974)

Sel de sodium (acétate, benzoate, butyrate, citrate, oxalate, propionate, pyruvate, succinate et tartrate): 2 g, NaCl: 2 g; MgSO₄, 7H₂O: 0,2 g; (NH₄)₂HPO₄: 1 g; KH₂PO₄: 0,5g; agar:15 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04%: 20 ml, pH 6,8.

La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

2.10.- Production de pigments mélanoïdes.

*** Milieu ISP6 (Shirling et Gottlieb, 1966)**

Peptone: 20 g; citrate ferrique ammoniacal: 0,5 g; K₂HPO₄: 1 g; thiosulfate de sodium: 0,08 g; extrait de levure: 1 g; agar: 15 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

*** Milieu ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966)**

Glycérol: 15 g; L-tyrosine: 0,5 g; L-asparagine: 1 g; K₂HPO₄: 0,5 g; MgSO₄,7H₂O: 0,5 g; NaCl: 0,5 g; FeSO₄, 7H₂O: 0,01 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 ml; agar: 18 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

2.11.- Production de nitrate réductase (Marchal et Bourdon, 1987)

Peptone: 1 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; KNO₃: 1 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 7,5.

La recherche de la nitrate réductase est effectuée grâce au réactif de Griess.

2.12.- Sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Le milieu " Glucose-Yeast Extract " (GYEA) liquide est utilisé pour le test de sensibilité aux pH 5 et pH 9.

Composition: glucose: 10 g; extrait de levure: 10 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml. pH 6,8.

2.13.- Sensibilité aux antibiotiques et à la température

Pour évaluer la sensibilité des actinomycètes, le milieu ISP2 solide a été utilisé. Les antibiotiques stérilisés sont rajoutés au milieu à raison de 30 µg ml⁻¹ pour le chloramphenicol, 15 µg ml⁻¹ pour l'érythromycine et 5 µg ml⁻¹ pour la novobiocine.

2.14.- Croissance en présence de NaCl

Milieu gélose nutritive contenant 4 et 5% de NaCl.

III. MILIEUX DE PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES

1.- Milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml.
pH 7,2.

2.- Milieu Bennett (Waksman, 1961)

Glucose: 10 g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; extrait de viande: 1 g; eau distillée:
q.s.p. 1000 ml. pH 7,2.

ANNEXE 2 RÉVÉLATEURS CHIMIQUES (Merck, 1975)

1.- Anisaldéhyde-acide sulfurique: révélateur des glucides, des stéroïdes, des terpènes et des phospholipides contenant de la glucosamine.

* Solution de vaporisation: solution fraîchement préparée de 0,5 ml d'anisaldéhyde dans 50 ml d'acide acétique cristallisable + 1 ml de H₂SO₄ concentré.

* Traitement complémentaire: chauffer 5 à 10 min à 100-105°C jusqu'à l'apparition des taches (rose-violet-gris).

2.- Naphtorésorcinol-acide sulfurique: révélateur des glucides.

*Solution a: dissoudre 0,2 g de naphtorésorcinol dans 100 ml d'éthanol.

*Solution b: acide sulfurique (à 20% dans l'eau).

*Solution de vaporisation: juste avant l'emploi, mélanger des volumes égaux de a et de b.

* Traitement complémentaire: chauffer 5 à 10 min à 100-105°C. Les taches apparaissent roses, violettes ou bleues.

3.- Chlorure de fer ferrique (FeCl₃): révélateur des phénols et des acides hydroxamiques.

* Solution de vaporisation: solution de FeCl₃ de 1 à 5% dans HCl 0,5 N. Les taches correspondant aux phénols sont colorées en bleu-vert et celles des acides hydroxamiques, en rouge.

4.- Formaldéhyde-acide sulfurique:révélateur des aromatiques polycycliques.

* Solution de vaporisation: dissoudre 0,2 ml d'une solution de formaldéhyde (37%) dans 10 ml de H₂SO₄ concentré.

Les taches apparaissent de diverses couleurs (brunes, blanchâtres, etc.).

5.- Ninhydrine: révélateur des amines, des acides aminés, des osamines et de laphosphatidyléthanolamine.

* Solution de vaporisation: dissoudre 0,2 g de ninhydrine dans 100 ml d'éthanol.

* Traitement complémentaire: chauffer à 110°C (5 à 10 min) jusqu'au développement optimal des taches (couleur violette ou rose).

6.- Vanilline-acide sulfurique: révélateur des alcools supérieurs, des stéroïdes et des huiles étherées.

* Solution de vaporisation: dissoudre 1 g de vanilline dans 1000 ml de H₂SO₄ concentré.

* Traitement complémentaire: chauffer à 120°C pendant 5 à 10 min. (couleurs violette, rose ou grise).

7.- Réactif de Dragendorff: utilisé pour révéler la phosphatidylcholine (PC).

* solution a: dissoudre 0,85 g de nitrate de bismuth basique dans 10 ml d'acide acétique cristallisé et 40 ml d'eau.

* solution b: dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 200 ml d'eau.

* solution de réserve: mélanger a et b (volumes égaux). Cette solution se conserve bien au réfrigérateur (flacon sombre).

* solution de vaporisation: avant emploi, mélanger 1 ml de solution de réserve, 2 ml d'acide acétique cristallisé et 10 ml d'eau.

Les taches de PC apparaissent orange-jaune.

8.- Bleu de molybdène (Minnikin et al., 1977)

Ce réactif est utilisé pour révéler les phospholipides après leur séparation par CCM bidimensionnelle.

Cette technique est préconisée pour séparer un mélange complexe de lipides polaires ou ceux qui migrent à des R_f très rapprochés lors d'une séparation par CCM unidimensionnelle. Pour cela, deux systèmes de solvants sont utilisés:

- chloroforme-méthanol-eau: 65/25/4, en volume (contenu dans une première cuve de chromatographie).

- chloroforme-acide acétique (glacial)-méthanol-eau: 80/15/12/4, en volume (contenu dans une deuxième cuve de chromatographie).

Après régénération de la plaque de gel de silice (G 60) à 120°C pendant 30 min, les échantillons sont spotés à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque (10x10 cm). Dans un premier temps, la plaque est placée dans la première cuve (dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le système de solvant durant 1 h). Après développement, la plaque est retirée de la cuve, et elle est séchée au sèche-cheveux.

La plaque est tournée d'un angle de 90° (rotation dans le sens d'une aiguille d'une montre), et elle est ensuite placée dans la deuxième cuve de chromatographie.

Après migration du deuxième système de solvant, la plaque est retirée et séchée. Elle est ensuite révélée par le bleu de molybdène (oxyde de molybdène à 1,3% dans l'acide sulfurique 4,2 M). Les phospholipides apparaissent en bleu.